



Etude de la modulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif par les protéines VP24 des virus Marburg et Ebola

Audrey Page

► To cite this version:

Audrey Page. Etude de la modulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif par les protéines VP24 des virus Marburg et Ebola. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2012. Français. NNT : 2012ENSL0706 . tel-00671994

HAL Id: tel-00671994

<https://theses.hal.science/tel-00671994>

Submitted on 20 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre :

Année 2011-2012

N° attribué par la bibliothèque :

THESE

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la Vie

LABORATOIRE DE VIROLOGIE HUMAINE INSERM U758

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 10/01/2012 par

Audrey Page

**ETUDE DE LA MODULATION DE LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS
OXYDATIF PAR LES PROTEINES VP24 DES VIRUS MARBURG ET EBOLA**

Directeur de thèse : Pr Viktor Volchkov

Après avis de : Dr Michèle Bouloy

Pr Winfried Weissshenhorn

Devant la commission d'examen formée de :

Dr Théophile Ohlmann, examinateur

Dr Jean Marc Vanacker, examinateur

Dr Hervé Raoul, examinateur

Dr Michèle Bouloy, rapporteur

Pr Winfried Weissshenhorn, rapporteur

Pr Viktor Volchkov, membre

*A Alex...
En espérant que de là-haut, tu sois fier de ta frangine
Tu me manques.*

Remerciements

En premier lieu, je veux remercier le Professeur Viktor Volchkov pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, avoir permis la réalisation de ce travail, pour la confiance qu'il m'a accordée, et pour nos discussions scientifiques. Je veux également remercier François Loïc Cosset, directeur de l'U758.

Merci également à mes rapporteurs, le Dr Michèle Bouloy et le Pr Winfried Weissenhorn, pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Merci aux autres membres du jury, le Dr Théophile Ohlmann, le Dr Hervé Raoul et le Dr J-M Vanacker pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Aux membres passés et présents de l'ancienne équipe des Filovirus, aujourd'hui devenue « Equipe des bases moléculaires de la pathogenèse virale », un grand merci pour la bonne humeur quotidienne, les lab-meetings, les tea-time, le chocolat sur le frigo, etc. Et particulièrement... Merci au Dr Robin Buckland pour ses sarcasmes et ses corrections de mon accent auvergnat pas toujours compréhensible, et pour avoir pris le temps de relire mon manuscrit ; Merci à Hasan et à Michelle d'avoir eu le sourire tout le temps. Merci à Valentina pour son optimisme à toute épreuve, pour avoir toujours eu des paroles rassurantes, et pour sa douceur. A Miquel et Sébastien, pour nos bons moments et toutes ces pauses café. Aux anciennes avec qui je n'ai pas travaillé, Caroline et Nathalie, merci pour vos précieux conseils et vos encouragements. Aux stagiaires de passage, Cydnie, Jennifer, Tanel, Jérémy, merci pour les quelques discussions non scientifiques que nous avons pu avoir. Et puisqu'il est question de stagiaire, à Marie-Pierre, MA stagiaire, merci pour ta joie de vivre et ta curiosité, et bravo pour tes progrès en orthographe ! A celle qui m'a accompagné jusqu'au bout, Béatriu, merci pour ta bonne humeur, pour ces moments de confiance, pour avoir partagé mes doutes de thésarde, pour les Kinder Bueno et les fous-rires à n'importe quelle heure. 5800 mercis pour toi ! Enfin au nouvel arrivant, Jimmy, merci d'être venu égayer mes derniers mois de thésarde en papotant rugby... A vous deux, bon courage pour la suite, je suis convaincue que vous réussirez !

A la « VP24 team » : Mathieu, St Patrick et Kirill, merci ne suffirait certainement pas à témoigner ma gratitude, quelle chance j'ai pu avoir de travailler avec vous, et d'avoir appris autant de chacun d'entre vous ! Merci déjà pour toutes ces manip en commun, Merci à Mat pour les pauses café-clope et les discussions scientifiques mais pas seulement, merci à Patrick pour m'avoir fait murir dans mes raisonnements et merci à Kirill pour sa gentillesse, la « gentleman-attitude » et à vous trois, merci pour les séances de Brain Storming à toute heure (y compris le soir très tard et le samedi matin très tôt) pour comprendre les rouages des VP24 et du stress oxydant. Ça n'a été (presque) que du bonheur, et je n'aurai pas pu trouver meilleurs compagnons pour ramer avec moi !

A la famille Reynard, un grand merci, non seulement à Olivier pour ses conseils de « daddy » et ses « tips » indispensables pour simplifier notre vie au labo, mais également à ta femme et tes filles, pour ces petits moments partagés hors des murs du labo. A la famille Ottmann-Terrangle, la même chose. Merci à Michèle d'avoir accepté de voir autre chose en moi qu'une petite étudiante de Master, merci pour les manip de la première heure, et pour tout ce qui a suivi, les diners et les confidences, et les réflexions sur l'être humain... Et merci à tes trois tornades pour leurs sourires d'enfants.

A nos collaborateurs, merci à Vincent Lotteau pour les manip levures. Merci à Lionel pour tous les conseils et pour n'avoir pas râlé le jour où mon erlen s'est renversé dans l'incubateur ! Merci aux membres de l'équipe IMAP version 2007-2008 : à Thibault, à Marcus, à Bruna, à Anne, à Fabrine, et à ceux que j'oublie. Merci pour les bons moments au labo et à l'extérieur, et pour votre bonne humeur communicative ! Une pensée spéciale pour Chantal Rabourdin-Combe, qui co-dirigeait l'IMAP avec Vincent Lotteau.

Au Dr Jean-Marc Vanacker, pour avoir mis à ma disposition des outils pour les manip'ERR, pour son enthousiasme communicatif et pour sa disponibilité. A Juliette, merci pour avoir toujours eu des cellules ERR^{-/-} et des Hela à portée de main !

A la « dream-team » scaphandre, un énorme merci ! A son directeur et à sa directrice adjointe, les Dr Hervé Raoul et Caroline Carbonnelle, merci pour m'avoir autorisé à utiliser le labo. Pour m'avoir attendue pendant mes manip à rallonge (SMund, DC, LB), pour avoir contrôlé mes inactivations (SM,

SMund, AD, FJ, AV, AB), pour m'avoir formé au scaphandre (MCGC, SL), pour m'avoir permis d'être en sécurité là haut (AP, JL, CL, CB), pour avoir toujours répondu présent en cas de souci de connexion au RCH-P4 (HPP), pour n'avoir presque pas râlé lors de mes demandes tardives d'entrée ou de sortie d'échantillons (CL, SM, SMund) et pour avoir partagé avec moi, une pause clope, une ultracentrifugeuse, une virée Ninka et surtout pour m'avoir achevé au cours d'une partie de pendu mémorable un 22 Décembre à 13h30, merci à SM. Et bien sûr merci à l'indispensable PCS, et à tous pour le travail complexe que vous fournissez, et dont nous, utilisateurs, n'avons pas toujours conscience. Aux autres collègues de scaphandre, Olivier P., Marie, Cyrille, Raquel, Christophe P., Stéphanie R., Sylvain, Marion, Séverine, etc. merci pour m'avoir attendu ou laissé passer première à la douche, pour avoir rangé mon scaphandre, et pour vos conseils lors de mes 1ères entrées.

A nos voisins de l'UBIVE, et à l'équipe BH, merci pour un papotage de couloir, un conseil ou un paquet de Flask quand nous étions en rupture de stock !!! Enfin à la joyeuse équipe du CIC de Lyon, et en particulier à Ségolène Gaillard et à Catherine Cornu pour cette initiation à la Recherche Clinique enrichissante.

Et hors du labo....

Merci à Dr Mimi, Dr Tat, pour avoir relu une partie de ce travail. Merci à future Dr Dodo pour avoir été en même temps que moi, dans le même état, et pour le soutien réciproque que cette situation a généré. A vous trois, merci pour nos soirées, nos escapades, et pour avoir toujours été un soutien juste et conséquent.

A Gosia, pour avoir fait naître une amitié franco-polonaise, pour ta gentillesse et ta sensibilité. Et pour être à l'origine du désormais célèbre : « Quiet and Self-Confident » !

Au tout nouveau Dr Pablo, merci pour les franches rigolades et pour m'avoir permis d'identifier une toute nouvelle maladie, « la Pabloïte Aigue » ! A Miniwee, qui lui aussi, un jour, sera Dr, à Dr Fadi, la distance ne change rien à mon attachement pour vous !

Merci à tous mes potes auvergnats non-scientifiques, qui ne comprennent rien à la biologie moléculaire des Filovirus, et par conséquent, merci pour tout ce que nous vivons qui n'a rien à voir avec de la science : Tuff, Viallou (Sibyl), Maxx, Jérôme (Laura), Coco, Greg. Merci d'avoir été présents pour moi quand il le fallait, et merci pour vos bêtises de mecs, pour toutes ces soirées, merci pour la joie de vivre !

Merci à mes plus vieilles amies, Sylvie et Julie, pour avoir toujours cru en moi, euh... depuis la 6^{ème} ??? 18 ans d'amitié, il y aurait beaucoup trop de choses à dire. Merci d'être restées !

Merci à ma binôme d'être restée ma binôme hors des murs de l'IUT et d'être devenue une amie aussi fidèle. Merci pour m'avoir confié le rôle de témoin un des jours les plus importants de ta vie, merci pour ta confiance. Merci pour avoir fait en sorte qu'en M1, je ne plante pas tout ! ça valait vraiment le coup !

A ma famille et à ma belle-famille, et plus particulièrement, mes grands-parents, mes cousins - Mary, Romain, Ju, Aurél, Lu, Adèle et Mathilde, etc. -, à Nadine, à Denis, à Aline, à ma marraine. Merci pour m'avoir aidé à surmonter l'insurmontable et à retrouver un équilibre.

Aux enfants qui m'entourent : Enaël, Mattéo, Carla et Timéo, merci. Pour vos sourires, vos fous-rires et votre innocence.

Merci à mes greluches : Sylvaine, Marlène et Sophie... Il n'existe pas de mot pour exprimer le bonheur que j'ai à vous avoir dans ma vie. Il existe peut être une question : « je ferai quoi si vous n'étiez pas là ? »

A mes parents, merci pour m'avoir montré le chemin à suivre, merci pour être toujours présents quand j'ai besoin de vous. Merci d'être restés, malgré les caprices de la vie, un exemple de réussite et de stabilité. Je suis fière de ce que vous êtes et je suis fière d'être votre fille.

A Anthony, pour avoir décidé, un jour de 2005, de partager ta vie avec la mienne, et pour n'avoir jamais changé d'avis. Merci pour ces années de bonheur, pour ta main qui n'a jamais lâché la mienne, pour toutes ces promesses tenues, et pour le futur que nous construisons chaque jour.

A tous ceux qui ne se sont pas retrouvés dans cette liste... je vous remercie d'autant de ne pas m'en vouloir de vous avoir oublié.

Résumé

Les virus Ebola (EBOV) et Marburg (MARV) sont responsables de fièvres hémorragiques sévères chez les primates, y compris l'homme. Lors d'épidémies dans la population humaine, le taux de létalité peut atteindre 90% et il n'existe ni vaccin ni traitement pour lutter contre ces virus. L'infection induit le recrutement de cellules phagocytaires, et une libération massive de cytokines pro-inflammatoires et de monoxyde d'azote, cet orage cytokinique étant responsable du syndrome de choc conduisant à la mort des sujets. En raison de leurs caractéristiques moléculaires communes, EBOV et MARV sont regroupés au sein de la famille des *Filoviridae*. Le virion est composé de 7 protéines structurales, dont la protéine VP24, qui joue un rôle important dans l'assemblage et la condensation des nucléocapsides virales, et dans le cas d'EBOV, elle est également responsable de l'inhibition de la réponse à l'IFN. Des mutations dans la séquence protéique de VP24 sont impliquées dans le processus d'adaptation et le développement de la pathologie chez un nouvel hôte. La protéine VP24 d'EBOV possède donc plusieurs fonctions. Dans le cas de MARV, cette protéine a été beaucoup moins étudiée jusqu'ici, et ne semble être impliquée ni dans le contournement de la réponse à l'IFN, ni dans le processus d'adaptation, ces fonctions étant portées par la VP40. Dans ce contexte, afin de déterminer de nouvelles fonctions de la VP24 de MARV, nous avons identifié ses partenaires cellulaires par un crible double-hybride en levures. Nous avons ainsi mis en évidence l'interaction entre Keap1 et la VP24 de MARV, et ce résultat a été confirmé en cellules mammifères. Keap1 est une protéine impliquée dans la détection intracellulaire des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et dans le contrôle de la réponse au stress oxydatif, car elle inhibe le facteur de transcription Nrf2, qui régule l'expression d'enzymes impliquées dans la réduction des ERO. Nous avons évalué les conséquences de l'interaction Keap1/VP24 sur l'activité de Nrf2. Nos résultats indiquent que le domaine de Keap1 liant la VP24 est le même que celui liant Nrf2, et que la VP24 de MARV est capable d'activer Nrf2 pour la synthèse de molécules anti-oxydantes. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'activité d'une autre cible de Keap1, le facteur ERKα, un récepteur nucléaire impliqué dans le contrôle de la transcription de gènes importants pour la migration, la division et la survie cellulaire. De même que précédemment, nos résultats indiquent que la VP24 activerait ce facteur de transcription. Ce travail identifie une nouvelle fonction de la VP24, l'induction d'un mécanisme de protection cellulaire, qui faciliterait la survie des cellules infectées dans un environnement défavorable. Enfin, nous avons mesuré l'activité de la voie Nrf2 lors de l'infection par EBOV, et de façon surprenante, démontré que cette voie est inhibée par la VP24 d'EBOV. Ce résultat très inattendu met en évidence pour la première fois une divergence fonctionnelle entre les virus EBOV et MARV.

La modulation de l'activité de Nrf2 par les protéines VP24 des Filovirus pourrait jouer un rôle important dans le développement de la très haute pathogénicité des infections à Filovirus, et par conséquent, la mise au point de stratégies visant à contrecarrer cet effet des VP24 pourrait être une approche intéressante pour le traitement des fièvres hémorragiques à Filovirus.

Abstract

Ebola (EBOV) and Marburgvirus (MARV) are responsible for severe hemorrhagic syndrome in primates, including humans. The lethality rate can reach 90%, and to date, no vaccine or treatment is available to counteract these diseases. During the infection, phagocytic cells are recruited to the site of infection, resulting in a massive release of pro-inflammatory cytokines and of nitric oxide. This “cytokine storm” is responsible for the shock syndrome which leads to the death of infected subject. EBOV and MARV have similar genomic organization and thus are placed in a distinct family, *Filoviridae*. VP24 is one of the 7 structural proteins which form the virion and has been shown to play an important role in assembly and condensation of viral nucleocapsids. VP24 of EBOV is responsible for prevention of cellular response to IFN. Mutations in EBOV VP24 gene appeared during the adaptation of EBOV to rodents and were necessary for the successful adaptation to a new host. EBOV VP24 thus seems to act as a multifunctional factor. So far, MARV VP24 has not been intensively studied, however available data suggest that it is not implicated in either the counteraction of IFN response, or in the adaptation process. In order to discover new functions for VP24 of MARV, we searched for its interaction with cellular proteins, using a yeast-double hybrid approach. We discovered an interaction between MARV VP24 and Keap1 protein and further confirmed this interaction in mammalian cells. Keap1 is a cellular protein involved in intracellular detection of Reactive Oxygen Species (ROS) and in the control of oxidative stress response. It inhibits the Nrf2 transcription factor, which regulates expression of antioxidant enzymes. Detailed investigation of the effect that VP24/Keap1 interaction has on Nrf2 activity demonstrated that Keap1 binds to VP24 via the same domain as the one involved in Nrf2 binding, and that VP24 binding to Keap1 activates Nrf2, resulting in the synthesis of anti-oxidant proteins. Then, we evaluated activity of another protein controlled by Keap1, the nuclear receptor ERR α . This protein acts as a transcription factor regulating genes involved in cell migration, division and survival. Similar to its effect on Nrf2, VP24 increases to activate ERR α activity. Taken together, these results demonstrate a novel function of VP24, which is the induction of a mechanism of cellular protection, which could facilitate survival of infected cells in an unfavorable environment. Furthermore, we studied the effect of EBOV infection on Nrf2 pathway and discovered that, unlike MARV, EBOV inhibits activation of Nrf2 and that VP24 protein is responsible for this inhibition. Thus, our results reveal first functional difference between MARV and EBOV.

Modulation of Nrf2 activity by VP24's of both Filoviruses could play an important role in the development of high pathogenicity of these viruses, and consequently, strategies aiming at the counteraction of this activity could be an interesting therapeutic approach for treatment of Filoviral hemorrhagic fevers.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION.....	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I. Première Partie : Les Fièvres Hémorragiques Virales	15
A. Les virus comme agents causatifs de Fièvres Hémorragiques.....	15
1. Les Arénavirus et le virus de Lassa.	15
2. Les Bunyavirus.	15
3. Les Flavivirus.....	16
B. Données épidémiologiques	17
1. Les Fièvres Hémorragiques à Arbovirus	17
2. Les Fièvres Hémorragiques dont le réservoir est un rongeur.	17
C. Tableau clinique et évolution de la maladie	18
II. Deuxième Partie : Les Filovirus	19
A. Découverte	19
B. Epidémiologie	20
C. Données phylogénétiques	24
1. Taxonomie	24
2. Histoire Naturelle	25
i. Le schéma d'infection classique :	25
ii. Le porc, un vecteur des Filovirus jusqu'ici ignoré ?.....	26
iii. Multiplicité des lignées de Filovirus et persistance dans le réservoir	27
3. Intégration de séquences génomiques des Filovirus chez certains vertébrés.	28
D. Physiopathologie de l'infection	30
1. Tableau clinique : des signes non spécifiques	30
2. Pathogenèse induite par l'infection à Filovirus	31
i. Dissémination du virus dans l'organisme.....	32
ii. Effets sur la cellule infectée :	33
a. Tropisme cellulaire.....	33
b. Effets cytopathiques viraux.....	33
iii. Dérégulation du système immunitaire de l'hôte	34
a. Suppression de la réponse immunitaire innée	34

b.	Modifications des réponses adaptatives	37
c.	Apoptose « passive » des lymphocytes	38
d.	Choc septique	38
iv.	Cas des Infections asymptomatiques	39
E.	Données Moléculaires	40
1.	Le virion	40
i.	Composition de la RiboNucléoParticule (RNP)	41
a.	L'information génétique	41
b.	La Nucléoprotéine (NP)	43
c.	La protéine VP30	44
d.	La protéine VP35	45
e.	L'ARN polymérase ARN dépendante L (Large)	46
ii.	Les protéines de matrice	46
a.	La protéine majeure de matrice : VP40	46
b.	La protéine VP24 : une protéine unique	48
iii.	La protéine de Surface (GP)	49
2.	Les protéines solubles	50
i.	La GP soluble, sGP.	51
ii.	La GP _{1, 2, Δ}	51
iii.	La VP40	51
3.	Cycle réplcatif	52
i.	Les phases précoces : de l'attachement du virus à la synthèse de nouvelles sous unités virales : ..	52
ii.	Les phases tardives : transport, assemblage et bourgeonnement :	54
F.	Modèles d'étude	55
1.	Les modèles animaux	55
i.	Les primates non humains	55
ii.	Les virus adaptés aux rongeurs	56
a.	La souris	57
b.	Le cobaye.	58
iii.	Le porc, un nouveau modèle ?	59
2.	Etude in vitro des Filovirus	60
i.	Production de virus à partir d'ADN complémentaire	60
ii.	Des outils pour travailler hors du laboratoire P4	61
iii.	Mise au point d'une lignée de chauve-souris supportant la réplication des Filovirus	63
G.	Diagnostic, Prophylaxie et Traitement	63
1.	Diagnostic	63
2.	Prophylaxie	64
i.	Protection Physique et contenance de l'épidémie	64
ii.	Mise au point d'un vaccin contre les Filovirus	66
a.	Enjeux et difficultés de la recherche vaccinale contre les Filovirus	66
b.	Caractéristiques des différents vaccins	66
3.	Essais thérapeutiques	69
i.	Traitements symptomatiques	69
ii.	Traitements spécifiques visant à bloquer la réplication virale	69
III.	Troisième Partie : Stress Oxydatif et Infection virale, importance de la voie Keap1 – Nrf2.	71
A.	Introduction	71
B.	Fonctionnement moléculaire	71
C.	La voie Keap1 –Nrf2, une cible privilégiée des infections virales ?	78

OBJECTIFS DE LA THESE.....	81
RESULTATS	82
1ERE PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS DE MARBURG AGIT COMME UN ACTIVATEUR DE NRF2, EN CIBLANT LA PROTEINE KEAP1	82
Identification de la protéine Keap1 comme partenaire cellulaire de la protéine VP24 de MARV.	82
Identification des résidus de Keap1 impliqués dans son interaction avec VP24	90
Etude des conséquences de l'interaction Keap1-VP24 sur l'activité de Keap1	93
L'expression de la VP24 active la voie de signalisation médiée par Nrf2, en transfection et en infection.	96
2EME PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS DE MARBURG ACTIVE LE FACTEUR NUCLEAIRE ERRα.	98
3EME PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS EBOLA EST UN INHIBITEUR DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2	104
La protéine VP24 du virus Ebola inhibe l'activité de Nrf2	104
Etude du mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition de Nrf2 par la VP24.	109
Recherche des partenaires cellulaires des protéines VP24 des virus Ebola Zaïre et Ebola Reston et identification d'une nouvelle cible de la VP24.	114
DISCUSSION.....	118
La protéine VP24 du virus de Marburg active le facteur Nrf2 et la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire.	120
La protéine VP24 de MARV serait un régulateur du facteur cellulaire ERR α	124
La protéine VP24 du virus Ebola est un inhibiteur de la réponse au stress oxydatif cellulaire médiée par Nrf2.....	127
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	133
MATERIELS ET METHODES	135
ANNEXES	142
ANNEXE 1: ABSTRACT DE LA PUBLICATION EN COURS D'ECRITURE.....	142
ANNEXE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PRESENTATIONS.....	143
Liste des publications :.....	143
Participation aux colloques, congrès et séminaires – Liste des posters :	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144

Liste des Abréviations

2'-5'OAS	2'-5' OligoAdenylate Synthetase
3AT	3-amino-1,2,4-triazide imidazoleglycerol phosphate dehydratase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARE	<i>Antioxydant Response Element</i>
Bcl2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPCO	Broncho Pneumopathie Constructive Obstructive
BTB	drosophila Broad complex C, Tramtrack and Bric-a-brac (POZ)
BSL4	Biosafety Level 4
CBP	CREB Binding Protein
CCHFV	Virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo
CIVD	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CREB	cAMP Response Element Binding
CRIF1	CR6 Interacting Factor 1
CTR	Carboxy terminal Region
CUL3	Cullin 3
DC	Dendritic cell, Cellule Dendritique
DGR	Double Glycin Repeat
EBOV	Virus Ebola
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ERR α	Estrogen-receptor related-receptor alpha
ERRE	Estrogen-receptor related receptor Element
ESTs	Expressed Sequence Tags
FAC1	Fetal Alz Clone 1
FAS	Fas-associated death protein domain
FasL	Ligand de Fas
FH	Fièvre Hémorragique
FHV	Fièvre Hémorragique Virale
GCL	Glutamate Cystein Ligase, GCLC: sous unite Catalytique
GP	Glycoprotéine
GSTA1	Gluthatione S-Transferease
HDAC2	Histone Deacetylase 2
HO1	Heme Oxygenase 1
IFN	Interferon
IFNAR	IFN alpha Receptor
Ig	Immunoglobuline; IgG : Immunoglobuline G ; IgM : Immunoglobuline M
IL	Interleukine
IKK	I κ B Kinase, IKK β : I κ B Kinase beta, IKK ϵ : I κ B Kinase epsilon
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthetase
IRF	Interferon Response Factor
ISRE	IFN Stimulated Response Element
IVR	InterVening Region
Jak1	janus Kinase 1
Keap1	Kelch-like ECH Associated Protein 1
KLHL12	Homo sapiens Kelch-like protein 12
KPNA	Karyophérine alpha

LHB	Large Hepatitis B surface protein
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
LPS	LipoPolySaccharide (bactérien)
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MARV	Virus Marburg
MCMV	Murine CytoMegaloVirus
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein 1
MIP1	Macrophage Inflammatory Protein 1
MOI	Multiplicity of Infection
MoMuLV	Virus de la Leucémie Murine de Moloney
MVB	MultiVesicular Body
Neh	Nrf2 ECH Homology
NFκB	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NO	Nitric Oxide, Monoxyde d'Azote
NK	Natural Killer
NP	Nucléoprotéine
NQO1	NADPH: Quinone Oxidoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NTR	Amino Terminal Region
PACT	Protein Activator of PKR
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	ParaFormAldéhyde
PFU	Plaque Forming Unit
PGAM5	Phosphoglycerate Mutase family member 5
PIAS1	Protein Inhibitor of Activated STAT1
PKC	Protein Kinase C
PKR	Protein Kinase RNA activated
POZ	Pox Virus and Zinc finger protein (equivalent de BTB)
PMO	Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers
PNH	Primates Non Humains
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
rNAPc2	recombinant Nematode Anticoagulant Portein c2
RHDV	Virus de la maladie Hémorragique du Lapin
RIG1	Retinoic Acid Inducible Gene1
RLRs	RIG1-Like Receptor
RNP	RiboNucléoParticule - Nucléocapside
RSV	Virus Respiratoire Syncytial
RT	Reverse Transcription, RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RVFV	Virus de la Fièvre Hémorragique de la Vallée du Rift
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SFN	Sulforaphane
sGC	Guanylate Cyclase soluble
sGP	Glycoprotéine soluble
SPIN90	SH3 Protein Interacting with Nck, 90 kDa
SPOP	Speckle-type POZ(BTB) protein
SRS	Suppressor of RNA Silencing
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBK1	TANK-binding Kinase 1
tBHQ	tert-Butylhydroquinone
TCID50	Tissue Culture Infectious Dose 50
TIM1	T-cell Immunoglobulin and mucin domain 1

TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand
TRBP	TAR RNA Binding Protein
TREM1	Trigerring Receptor Expressed on Monocytes 1
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VEEV	Virus de l'Encephalite Equine Vénézuélienne
VLP	Virus-Like Particule
VP	Viral Protein
VRP	VEEV-Replicon Particule
VSDRP	virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse

Introduction

Bien que connu depuis maintenant plus de 35 ans, le virus Ebola apparaît toujours comme une menace aux yeux du grand public, mais également aux yeux des spécialistes, l'utilisation de ce virus comme arme bioterroriste étant crainte. Et finalement, la difficulté à mettre en place un vaccin ou un traitement efficace contre ce virus laisse penser qu'il est légitime de craindre un virus pouvant tuer 60 à 90% des personnes qu'il infecte. Le virus Marburg, tout aussi dangereux, reste moins connu. Ayant été responsable d'épidémies avec des taux de mortalité élevés beaucoup plus tard (voir **Tableau 1** p16), il a longtemps été laissé de côté, tant au niveau médiatique qu'au niveau de la recherche scientifique, alors qu'il avait pourtant émergé le premier, en 1967. Aujourd'hui, les connaissances actuelles sur le virus Ebola sont transposées au virus de Marburg, mais, comme nous le verrons au cours de cette étude, ces deux virus, bien qu'issus de la même famille, ont des fonctionnements bien différents. En particulier, ces virus ont développé des mécanismes différents pour contrer les défenses des cellules qu'ils infectent. Une bonne appréhension de ces deux agents très hautement pathogènes nécessite donc de les étudier indépendamment.

Les Filovirus sont responsables d'épidémies fulgurantes qui émergent, à l'exception de la souche Reston du virus Ebola, en Afrique centrale. Ces épidémies touchent les hommes et les primates, mais semblent peu affecter les autres genres du règne animal, ce qui a également compliqué leur étude. Ces virus provoquent un syndrome de Fièvre Hémorragique Virale (FHV), et leur caractère hautement pathogène semble résider dans leur capacité à détourner la réponse immunitaire de l'hôte : d'un côté, ces virus empêchent la mise en place d'une réponse immunitaire innée, en infectant les macrophages et les cellules dendritiques et en les empêchant de mettre en place les signaux nécessaires pour le montage d'une réponse immunitaire adaptative, qui d'un autre côté se voit bloquée par l'induction d'une apoptose massive des lymphocytes, cellules clés de l'immunité adaptative. En parallèle, les forts signaux inflammatoires envoyés par les cellules infectées induisent l'attraction au site de l'infection de nouvelles cellules cibles, amplifiant ainsi le phénomène de réplication virale. Dans ce contexte, la compréhension des événements moléculaires qui gouvernent la réplication des Filovirus au sein des Cellules Dendritiques et des Macrophages est cruciale pour le développement de stratégies visant à empêcher les maladies induites par les Filovirus.

Les Filovirus, dont l'information génétique est codée par un ARN simple brin, appartiennent à l'ordre des Mononegavirales. Une des caractéristiques de ces virus est la présence de deux protéines additionnelles par rapport aux autres virus de cet ordre : la protéine VP30 d'une part, important régulateur de la transcription, et la protéine VP24, qui s'apparente aux protéines virales de matrice, mais dont le rôle au cours du cycle réplcatif viral reste énigmatique.

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre le rôle de la protéine virale VP24 dans le développement de la très haute pathogénicité des infections causées par le virus Marburg. En effet, bien que la protéine VP24 du virus Ebola ait été récemment identifiée comme facteur de virulence, il semble que ce rôle soit plutôt porté par la protéine VP40 pour le virus Marburg, et les faibles connaissances concernant la protéine VP24 ne permettent pas de conclure sur son rôle au cours des infections à Marburg, bien qu'elle soit indispensable au virus. Dans ce contexte, nous avons découvert que les protéines VP24 d'EBOV et MARV étaient impliquées dans la modulation de la

réponse cellulaire au stress oxydant, mettant ainsi en lumière une nouvelle fonction de ces protéines. De plus, nous avons découvert pour ces deux protéines une liste de partenaires cellulaires potentiels.

Dans l'étude bibliographique de ce manuscrit, après avoir introduit succinctement les différentes origines et étiologies des Fièvres Hémorragiques Virales (FHV), une revue détaillée de la littérature sur les Filovirus sera présentée. Les aspects épidémiologiques, les données médicales, ainsi que les connaissances moléculaires concernant ces virus seront exposées, avant de décrire dans la dernière partie de cette étude bibliographique, le phénomène de stress oxydatif cellulaire, et en particulier la voie moléculaire Keap1-Nrf2 qui permet de combattre les dommages oxydatifs cellulaires. Les résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse seront ensuite présentés, avant d'être replacés dans le contexte bibliographique et discutés en regard des connaissances actuelles.

Etude Bibliographique

I. Première Partie : Les Fièvres Hémorragiques Virales

Les Fièvres Hémorragiques (FH) sont des syndromes rares, parfois graves et mortels, et dont l'agent causal est variable. Il peut s'agir soit d'une infection, soit d'une réaction métabolique en réponse à un traitement, à une piqûre d'insecte, ou à une morsure de serpent. Les infections responsables de FH peuvent être causées par des parasites, comme par exemple *Plasmodium falciparum* (induisant le Paludisme) ou encore les parasites du genre *Leishmania*, à l'origine de la Leishmaniose. D'autres inducteurs de FH peuvent être d'origine bactérienne, tels que *Haemophilus influenza*, les Streptocoques, Meningocoques et Pneumocoques qui causent des septicémies. Les bactéries du genre *Borrelia* et *Leptospira*, sont respectivement responsables de la Borréliose (aussi appelée Maladie de Lyme) et de la Leptospirose. L'évolution grave de ces maladies peut induire des événements hémorragiques. Enfin, les FH peuvent être d'origine virale, et on parle dans ce cas de Fièvres Hémorragiques Virales (FHV), qui nous intéresseront plus particulièrement dans la suite de cette étude.

A. Les virus comme agents causatifs de Fièvres Hémorragiques.

Outre les Filovirus qui seront largement décrits dans la suite de cette étude, d'autres virus sont les agents causatifs de FHV. Ils appartiennent à trois familles virales différentes : la famille des *Arenaviridae*, la famille des *Bunyaviridae*, et la famille des *Flaviviridae*.

1. Les Arénavirus et le virus de Lassa.

Le virus de Lassa est endémique dans les régions d'Afrique de l'Ouest. Bien que le taux de létalité soit inférieur à celui des Filovirus, sa grande distribution et sa persistance à vie chez son hôte naturel, les rongeurs, induit une forte contamination des populations humaines par ce virus. Il a été découvert à la fin des années 60, et à l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin permettant d'envisager une éradication de cet agent.

Au sein des Arénavirus, d'autres virus ont été responsables de FHV : le virus de Junin, Machupo, Guanarito et Sabia, qui ont été identifiés en Amérique du Sud.

Les Arénavirus ont un génome à ARN négatif bisegmenté, avec une organisation ambisense unique.

2. Les Bunyavirus.

Au sein de la famille des Bunyavirus, des nombreux genres viraux peuvent être à l'origine de FHV. Il s'agit notamment des Nairovirus, avec le virus CCHF (Crimée Congo Haemorrhagic Fever). Ce virus est transporté par les tiques et a été découvert en Russie, mais également en Asie, et en Afrique [1].

Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (Rift Valley Fever Virus, RVFV) a également causé des FHV. Ce virus appartient au genre Phlebovirus, qui, comme son nom l'indique, regroupe des virus transportés par des Phlébotome. La contamination humaine est largement anecdotique, et c'est plutôt le bétail qui est touché par cette zoonose.

Enfin, les Hantavirus sont aussi des agents causaux de FHV. Ces virus ont pour hôte naturel les rongeurs, et, sont présents partout à la surface du globe. Ils sont responsables de Fièvre Hémorragique à Syndrome Rénal (Hantaan virus, Séoul virus, Puumala virus).

L'information génétique des Bunyavirus est portée par trois segments d'ARN négatif simple brin, qui peuvent, compte tenu de la grande variété de ces virus (certains non pathogènes pour l'homme) se retrouver au sein d'un même hôte au cours de leur cycle d'amplification. Dans ce contexte, le réassortiment génétique et l'apparition de nouveaux virus est fortement envisageable. Il est donc possible que d'autres Bunyavirus hautement pathogènes pour l'homme émergent dans les années à venir.

3. Les Flavivirus

La famille des *Flaviviridae* est la seule famille virale à ARN positif connue pour être responsable de FHV chez l'homme. Les Flavivirus ont leur information génétique portée par un ARN positif simple brin, et cette famille comporte plus de 70 virus différents [2]. Dans cette famille, 2 espèces virales sont principalement responsables du développement de FHV chez l'homme, il s'agit du virus de la Fièvre Jaune et du virus de la Dengue.

Le virus de la Fièvre Jaune est un des plus anciens virus connus, puisqu'il a été découvert au 16^{ème} siècle en Afrique. Ce virus a pour vecteur les moustiques du genre *Aedes* qui ont été à l'origine de sa dispersion. En effet, à la faveur des migrations par bateaux et des expansions coloniales, l'endémie africaine s'est ensuite rapidement étendue au continent américain et européen. Ce virus tient son nom de l'ictère qu'il impose aux personnes souffrant de fièvre jaune, qui revêtent alors « un masque amaril » caractéristique, qui laisse présager d'une phase dite jaune. Tous ces symptômes sont en fait la conséquence de troubles hépatonéphriques sévères.

Le virus de la Dengue a aussi été rapporté comme agent étiologique de FHV. Ce virus, transporté par les moustiques du genre *Aedes aegypti* a vu sa zone endémique s'étendre de l'Amérique du Nord et l'Océanie vers l'Asie au cours du conflit de la seconde guerre mondiale, et des migrations de populations. Plus tard, il sera également retrouvé en Afrique. Il existe quatre sérotypes différents pour ce virus. Les formes graves d'infection par le virus de la Dengue et le développement hémorragique subséquent apparaissent surtout chez les enfants et les adolescents [1], et sont notamment rapportés lors d'une seconde infection d'un même individu, cette seconde infection étant réalisée par un virus de sérotype différent de celui ayant causé la première infection.

Bien que le virus de West Nile soit décrit pour être responsable d'encéphalites et de méningites, en 2006, un patient mort suite à un syndrome de FH s'est avéré être infecté par ce virus [3], laissant supposer que le virus de West Nile pourrait lui aussi être un agent de FHV.

D'autres Flavivirus, dont les vecteurs sont les Tiques, ont été responsables de FHV en Europe Orientale et en Asie. Il s'agit des virus Omsk et Kyasanur qui portent les noms des forêts dans lesquelles ils ont été découverts.

B. Données épidémiologiques

On distingue donc 2 types de virus responsables de FHV :

1. Les Fièvres Hémorragiques à Arbovirus

Le terme Arbovirus vient de la contraction des termes anglais *Athropod-Born Viruses*. Ce sont les virus qui ont pour vecteur des arthropodes hématophages (moustiques, tiques et phlébotomes). Leur cycle naturel fait intervenir 3 acteurs majeurs :

- Le réservoir, qui peut être connu ou non
- Le vecteur, un arthropode
- L'hôte vertébré.

La présence de l'homme dans l'écosystème où se trouve le vecteur de ce virus est souvent à l'origine de la contamination humaine. Cette présence est souvent due aux activités humaines (tourisme, travail, chasse, etc.), mais l'écosystème viral peut aussi être déplacé vers l'homme (abattage massif d'arbres, qui déplaceront l'habitat des hôtes, changements climatiques).

Il peut donc y avoir plusieurs types de bouffées épidémiques pour ces virus : cas sporadiques, épidémies rurales ou urbaines, chacune étant dépendante de l'arthropode vecteur (les tiques causant par exemple plus de cas isolés que les moustiques qui pourraient être à l'origine de grosses flambées épidémiques au niveau rural ou urbain).

La dispersion de ces virus à la surface du globe est principalement due aux interventions humaines et aux flux migratoires de populations, qui ont induit des migrations des vecteurs viraux et donc l'émergence de virus responsables de FHV dans des zones où ils n'étaient pas naturellement présents.

2. Les Fièvres Hémorragiques dont le réservoir est un rongeur.

On retrouve dans cette catégorie les Hantavirus et les Arénavirus. Leur répartition géographique est circonscrite à l'environnement des rongeurs qu'ils ont pour réservoir. Par exemple, le virus de Lassa sévit uniquement en Afrique de l'Ouest. Toutefois, par comparaison aux Arbovirus, la durée de vie de leur réservoir et la persistance du virus chez les rongeurs (qui présentent une infection asymptomatique), ainsi que la transmission virale via les excréments, l'urine et la salive augmente l'exposition de l'homme à ces virus. Ainsi, ce sont 300000 à 500000 cas annuels de Fièvre à virus de Lassa qui sont recensés, et donc, avec un taux de létalité de 10%, ce sont 3000 à 5000 personnes qui meurent chaque année de FHV causées par Lassa. Par contre, les Hantavirus ont une répartition ubiquitaire à la surface du globe, et sont surtout endémiques dans les régions où le climat est tempéré, voire dans les régions froides. Ils ont aussi émergé lors des conflits : première guerre mondiale, guerre de Corée, guerre des Balkans, etc.

Pour ces virus, la contagion vient souvent de la promiscuité et d'une détérioration des conditions d'hygiène (guerre, déplacements de populations, catastrophes écologiques, etc) où les rongeurs se retrouvent plus proches de l'homme. La contamination humaine est liée à des contacts avec les excréments de rongeurs, par contamination de l'air (poussières, aérosols) ou enfin par ingestion de nourriture contaminée. On distingue donc des cas isolés (en Europe par exemple) et des flambées épidémiques, qui peuvent être rurales ou urbaines, en fonction du réservoir.

La lutte contre ces deux catégories de virus (Arbovirus et Virus dont le réservoir est un rongeur) pourrait passer par la tentative d'éradication systématique soit du réservoir (rongeur), soit du vecteur (arthropode) dans les régions où le virus a été identifié. La contamination inter-humaine a été rapportée dans certains cas, et la prise en charge des patients impose des mesures strictes de protection de l'environnement et du personnel soignant, afin d'éviter les infections nosocomiales (gants, masque, lunettes, décontamination du matériel à la javel ou au glutaraldéhyde et incinération des déchets). Les patients, quand cela est possible, sont placés en chambre d'isolement et des mesures de quarantaine stricte sont imposées aux proches qui ont été exposés.

C. Tableau clinique et évolution de la maladie

Bien que chaque syndrome de FHV soit causé par des virus différents, et donc que la symptomatique totale soit très variable d'une infection à l'autre, on peut dégager un consensus de signes cliniques qui permettent de constater la présence d'une FHV.

Le syndrome de FHV est initié par une période d'incubation de durée variable de 3 à 7 jours, mais pouvant être plus longue (dans le cas du virus Ebola, des incubations de 3 semaines ont été rapportées). Le début de la phase clinique est souvent accompagné de symptômes faisant penser à une grippe : douleurs articulaires, musculaires, maux de tête, fièvre. Ces signes seront suivis plus ou moins rapidement de manifestations hémorragiques ou d'éruption cutanée de type rash, pétéchies. Certains organes peuvent alors montrer une défaillance (atteinte du système hépatique et rénal dans le cas de la Fièvre Jaune, visuelle dans le cas du RVFV, ou encore atteinte du système rénal dans le cas du virus Puumala).

L'évolution de la maladie est difficile à évaluer : elle dépend du virus impliqué (genre, espèce, sous-type), de la qualité du système immunitaire de l'hôte, et de l'épidémie. Le syndrome hémorragique sera donc plus ou moins sévère : pétéchies et purpuras au niveau cutané, diarrhées et vomissements sanguins, hémorragies internes combinées à des atteintes de divers systèmes (cardiovasculaire et rénal, hépatique, biliaire, nerveux, etc).

A terme, le patient peut guérir suite à une longue convalescence, ou l'infection peut être fatale. Dans ce cas, la mort est causée soit par un choc hypovolémique (fuite plasmatique), soit par les hémorragies elles-mêmes, soit par une déficience de différents organes. Souvent, plusieurs causes sont associées pour entraîner le décès.

II. Deuxième Partie : Les Filovirus

A. Découverte

En 1967, en Allemagne, dans les villes de Marburg et de Francfort, des cas de FH ont été recensés. Les personnes infectées principalement travaillaient dans une fabrique de sérums et de vaccins qui utilisait des singes importés d'Ouganda. Dans le même temps, à Belgrade en Yougoslavie, des cas similaires de fièvre hémorragique se sont déclarés, chez des personnes en contact avec des singes provenant de la même origine. Les études alors réalisées ont innocenté tous les agents connus à l'époque pour être responsables d'un syndrome hémorragique [4], en même temps que la fatalité des cas augmentait et que la contagion s'avérait de faible intensité. Ainsi, 24 personnes ont été contaminées à Marburg, 6 à Francfort, et 2 à Belgrade. Sur ces 32 cas, 7 personnes sont décédées de cette infection, et peu de contaminations secondaires ont été observées.

L'identification de l'agent étiologique responsable de ces cas de FH a été possible au bout de trois mois, en réalisant des passages en série du virus sur des cobayes qui résolvaient normalement l'infection. Au bout du troisième passage, les cobayes ont aussi succombé à l'infection, ce qui a permis d'étudier plus en détail la réplication de l'agent responsable, et notamment d'identifier, dans les cellules d'organes infectés, des corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion ont permis de comprendre que la source de la maladie était d'origine virale, puis de réaliser des images de microscopie électronique pour identifier le virus responsable. Ce virus, de forme allongée [5, 6], ne ressemblait à aucune famille virale connue jusqu'alors. Ce virus fut baptisé du nom de « virus de Marburg » (MARV), ville dans laquelle les premiers cas ont été découverts.

10 ans plus tard, quasiment simultanément au Zaïre et au Soudan, sont apparus de nouveaux cas de FH, dont le tableau clinique ressemblait beaucoup à celui provoqué par Marburg en 1967 (forte fièvre, syndrome hémorragique grave avec Hémanthème, épistaxis et diarrhées sanguinolentes). Ces deux épidémies ont alerté la communauté médicale mondiale et ont provoqué de fortes inquiétudes, en raison de la rapidité de la contagion et de la virulence de la maladie. Les premiers échantillons prélevés sur les lieux de l'infection, et déposés sur des cellules Vero, ont permis d'identifier un virus, morphologiquement proche de MARV découvert en 1967 [7]. Pourtant, les tests de cross-réactivité antigénique entre les deux virus (celui de 1967 et celui de 1976) ont infirmé qu'il puisse s'agir d'une nouvelle épidémie à MARV. D'abord appelé « Marburg-like virus », cet agent fut ensuite baptisé virus Ebola (EBOV), du nom de la rivière Zaïroise proche de laquelle le premier cas fut rapporté. Les premiers tests ont montré que les sérums de patients infectés au Soudan reconnaissaient le virus isolé au Zaïre, laissant penser que ces deux virus étaient proches, sinon identiques [8]. Il a donc été décidé de les identifier en fonction du pays dans lequel ces virus ont été découverts, règle qui a perduré depuis. Lors des épidémies de 1976, 318 cas de FH à EBOV ont été recensés au Zaïre, avec un taux de létalité de 88%, alors qu'au Soudan, Ebola a fait 284 victimes connues, dont 53% n'ont pas survécu à l'infection.

La forme allongée de ces virus (**Figure 1**), et l'absence de caractéristiques morphologiques communes à d'autres familles virales ont conduit les experts à les classer dans une nouvelle famille, baptisée Filovirus en raison de la forme allongée et filiforme de ces virions.

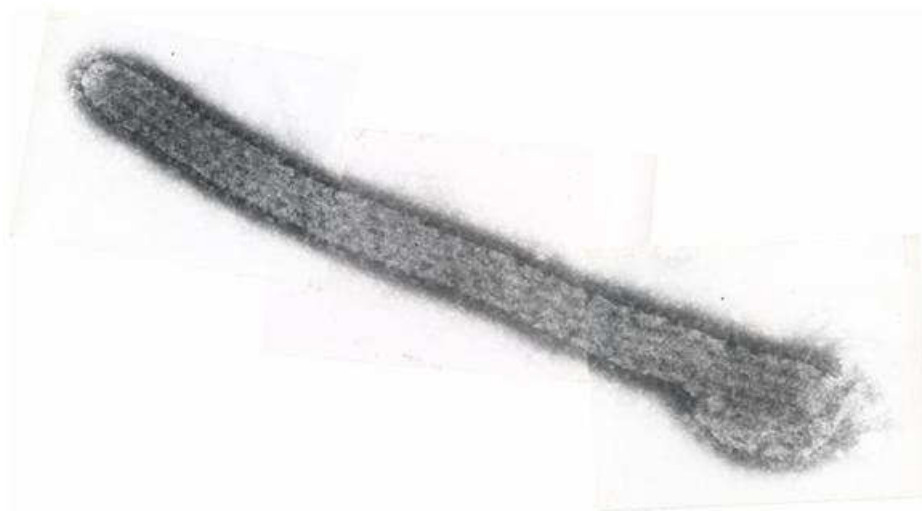


Figure 1 : Particule de virus Ebola. Photo reconstituée à partir de 3 clichés de microscopie électronique à transmission réalisés par le Pr V.Volchkov.

B. Epidémiologie

Depuis la découverte du virus de Marburg en 1967, puis du virus Ebola en 1976, des bouffées épidémiques causées par ces virus ont été fréquemment rapportées. Les cas humains, hors contamination de laboratoire (non relatées ici) sont apparus au cœur de l'écosystème tropical Africain, dans la région péri équatoriale. Alors que les épidémies sont souvent modérées et de courte durée, l'émergence de nouveaux cas dans ces régions est fréquente (Voir **Tableau 1**).

En particulier, en 1976, sont simultanément apparues des infections par les sous types Zaïre (en République Démocratique du Congo) et Soudan (au Soudan). Ces infections étant les premières relatées depuis l'apparition de MARV en 1967, les populations se sont retrouvées très démunies et la propagation et la contagion ont été importantes, avec plus de 500 cas relatés, pour ces deux épidémies [9]. C'est ensuite en 1989 que l'espèce Reston du virus Ebola (REBOV) a été découverte, lors de l'importation aux Etats-Unis de singes infectés en provenance des Philippines. A l'heure actuelle, aucun cas humain de Fièvre Hémorragique causée par le sous type Reston n'a été rapporté, laissant supposer que cette espèce serait peu ou pas pathogène de l'homme [10]. La découverte de cette espèce aux Philippines a mis en évidence des origines géographiques variables pour les Filovirus et leur dispersion possible à la surface du globe. En 1994, une femme ayant réalisé une nécropsie sur un singe trouvé mort dans la forêt de Taï Forest a été infectée par l'espèce Taï Forest (anciennement dénommé Côte d'Ivoire), mais cette infection n'a pas été fatale, et aucun autre cas d'infection avec cette espèce n'a été recensé jusqu'à présent [11]. En outre, il s'agit là du seul cas d'infection à Filovirus rapporté en Afrique de l'Ouest (voir **Figure 2**). En 1998, le virus de Marburg, qui avait jusqu'alors été la cause de quelques cas sporadiques de FH sans forte transmission, a surgit en République Démocratique du Congo, où il a été à l'origine de 141 cas de FH, avec un taux de fatalité de 88%. Il a ensuite ré-émergé en 2005 en Angola, faisant plus de 374 victimes.

En 2007, le virus Ebola est apparu dans la région Ouest de l'Ouganda, à proximité de la frontière avec la République Démocratique du Congo. Les symptômes des patients étaient non spécifiques d'une fièvre hémorragique (douleurs musculaires et articulaires, fatigue générale, maux de tête, diarrhées, perte de poids), sauf dans 54% des cas, où des hémorragies (nez, yeux, gencives, vagin ; selles, urine et vomissements sanguinolents) étaient associées aux autres symptômes [12]. Les techniques

sensibles de qRT-PCR et les tests antigéniques, basés sur les séquences des virus Marburg, Ebola soudan, Ebola zaïre n'ont pas permis d'identifier ce nouveau virus. C'est une technique moins sensible de RT-PCR sur la protéine L (Large), qui a confirmé qu'il s'agissait bien du virus Ebola [13]. La technique moderne de pyroséquençage [14], a permis un séquençage rapide du génome de cette nouvelle espèce. A partir de ces données, un test diagnostic de RT-PCR en temps réel, une méthode rapide et fiable pour l'identification des nouveaux cas, a été mise au point. Elle a permis de recenser 56 cas, certains en phase aiguë de la maladie. Plus tard, une technique plus conventionnelle de séquençage (« primer walking ») a permis de finaliser l'analyse de cette nouvelle espèce de virus Ebola, à qui il fut donné le nom du district dans laquelle elle a été identifiée, Bundibugyo. Cette épidémie a tué 17 personnes.

Enfin, en 2008, aux Philippines, des porcs présentant un syndrome respiratoire et abortif se sont révélés être infectés par l'espèce Reston du virus Ebola, en parallèle d'une infection par le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (VSDRP) [15]. Cette découverte a mis en avant un tropisme d'hôte différent de celui présumé jusqu'alors pour les Filovirus. De plus, la présence de marqueurs sériques pour le virus Ebola Reston chez les fermiers qui s'occupaient du bétail malade a mis en avant la possibilité d'une transmission porc/homme [16].

Le dernier cas rapporté d'infection humaine à Filovirus date du mois de Mai 2011, où une jeune fille de 12 ans est décédée en Ouganda suite à l'infection par l'espèce Ebola soudan [17].

Année	Espèce virale	Pays touché	Nombre de cas recensés	Taux de létalité
1967	Marburg	Allemagne Yougoslavie	31	23%
1975	Marburg	Afrique du Sud	3	33%
1976	Ebola Zaïre	RDC	318	88%
1976	Ebola Soudan	Soudan	284	53%
1977	Ebola Zaïre	RDC	1	100%
1979	Ebola Soudan	Soudan	34	65%
1980	Marburg	Kenya	2	50%
1987	Marburg RAVN	Kenya	1	100%
1989	Ebola Reston	Virginie, USA	0	0%
1990	Ebola Reston	Pennsylvanie, USA	0	0%
1992	Ebola Reston	Italie	0	0%
1994	Ebola Zaïre	Gabon	49	65%
1994	Ebola Taï Forest	Côte d'Ivoire	1	0%
1995	Ebola Zaïre	RDC	317	77%
1996	Ebola Zaïre	Gabon	37	57%
1996	Ebola Zaïre	Gabon	60	75%
1996	Ebola Reston	Texas	0	0%
1996	Ebola Reston	Philippines	0	0%
1998	Marburg	RDC	141	82%
2000	Ebola Zaïre	Ouganda	425	53%
2001	Ebola Zaïre	Gabon	123	79%
2003	Ebola Zaïre	RDC	143	90%
2005	Marburg	Angola	374	88%
2007	Ebola Bundinugyo	Ouganda	56	40%
2007	Marburg Marburg et Marburg Ravn	Ouganda	4	25%
2008	Ebola Reston	Philippines	0	0%
2008	Marburg	Pays-Bas	1	0%
2008	Marburg	Colorado, USA	1	0%
2011	Ebola Soudan	Ouganda	1	100%

Tableau 1: Liste des bouffées épidémiques à Filovirus recensées. Le taux de létalité correspond au nombre de cas fatals/nombre total de cas connus. RDC : République Démocratique de Congo (ex-Zaïre).

La transmission inter-humaine des virus se fait principalement par contact avec les fluides infectés (sang, sécrétions), soit lors de rites funéraires [18], soit au cours des soins apportés aux malades [19]. La transmission des Filovirus par voie aérienne a été supposée dans quelques cas où des personnes n'ayant pas eu de contact physique direct avec des patients infectés ont également développé une fièvre hémorragique [19]. Toutefois, cette voie de transmission ne semble pas être la plus efficace, étant donné que les infections sont toujours bien contrôlées grâce à des mesures strictes de quarantaine qui n'exigent pas de précautions spécifiques de filtration de l'air [20].

A world map with a light blue background and white country borders. Sampling locations are marked with colored dots: red, black, and green. Red dots are located in North America (USA and Mexico), Europe (UK, France, Germany, Italy, Spain, and Greece), and Africa (Morocco, Egypt, Sudan, Ethiopia, Kenya, Tanzania, and South Africa). Black dots are located in North America (USA and Mexico), Europe (UK, France, Germany, Italy, Spain, and Greece), and Southeast Asia (Philippines). Green dots are located in Africa (Morocco, Egypt, Sudan, Ethiopia, Kenya, Tanzania, and South Africa).

C. Données phylogénétiques

1. Taxonomie

Ce n'est que tardivement après leur découverte que les Filovirus ont pu être étudiés au niveau moléculaire, grâce d'une part à la mise en place de laboratoires avec niveau confinement élevé (BSL4 pour *Biosafety Level 4*), et d'autre part à l'essor des techniques de biologie moléculaire et de génétique inverse qui ont permis de produire ces virus et donc de les étudier à partir de leur seul génome.

L'information génétique des Filovirus est portée par un ARN simple brin de polarité négative, ils appartiennent par conséquent à l'ordre des *Mononegavirales* [22]. Ces virus ont un aspect allongé filamenteux en microscopie électronique, qui ne ressemble à aucun autre virus de l'ordre des *Mononegavirales*, c'est pourquoi ils forment une famille à part entière [23], les *Filoviridae*, au même titre que les *Paramyxoviridae*, les *Bornaviridae* ou les *Rhabdoviridae*, et que le taxon des *Nyavirus* [24], récemment inclus dans l'ordre des *Mononegavirales*.

Les différences de séquences nucléotidiques entre les Filovirus ont permis de les classer en 2 genres distincts, le Genre *Ebolavirus* et le genre *Marburgvirus*, qui sont différenciés par une divergence de séquence nucléotidique supérieure à 50%. Ces deux genres sont composés de plusieurs espèces (une espèce étant définie par une divergence de séquence nucléotidique supérieure à 30% et inférieure à 50%) :

- ➔ Pour le genre *Ebolavirus*, les espèces Zaïre, Soudan, Taï Forest (anciennement appelée Côte d'Ivoire), Reston et la plus récemment découverte Bundibugyo.
- ➔ Pour le genre *Marburgvirus*, on ne retrouve qu'une seule espèce, qu'il est proposé d'appeler Marburg *Marburgvirus* [25]. Au sein de cette espèce, les différences entre les séquences de virus ont induit la division en 2 groupes de virus : le virus de Marburg (*Marburg virus*, MARV), et le virus Ravn (*Ravn virus*, RAVV), ces deux virus ayant une différence de séquence nucléotidique de 21, 3%. Au sein du sous-type Marburg, il existe de nombreux variants viraux : le variant Popp (1967) [26], le variant Musoke (1980) [26], le variant RDC (1999) [27] et le variant Angola (2005) [28].

Le modèle actuel, basé sur des études phylogénétiques, et sur une analyse Bayésienne (*a posteriori*) des séquences des différents virus des genres Ebola et Marburg suppose que ces virus seraient issus d'un ancêtre commun, et que la grande variété de ces virus serait liée à une évolution indépendante de cet ancêtre commun dans des niches écologiques différentes (hôte différent, conditions environnementales différentes) [29] (**Figure 3**). Par conséquent, il est raisonnable de considérer que d'autres Filovirus pourraient être découverts à l'avenir, ceux qui sont connus actuellement ayant été identifiés seulement en raison des épidémies humaines qu'ils ont causées. La découverte récente du virus Lloviu au sud de l'Espagne [25, 30, 31] conforte cette hypothèse. La séquence entière du génome de ce virus a été isolée dans les organes de cadavres de chauve-souris de Schreiber [32], et son analyse révèle que ce virus est plus proche du genre Ebola que du genre Marburg, ce qui le classe pour l'instant comme un virus « Ebola-like ». Les chauves-souris de Schreiber sont présentes autour de la Méditerranée, laissant présager de la présence naturelle de ce nouveau genre de Filovirus non seulement dans le Sud de l'Espagne, mais également dans d'autres écosystèmes du Sud de l'Europe.

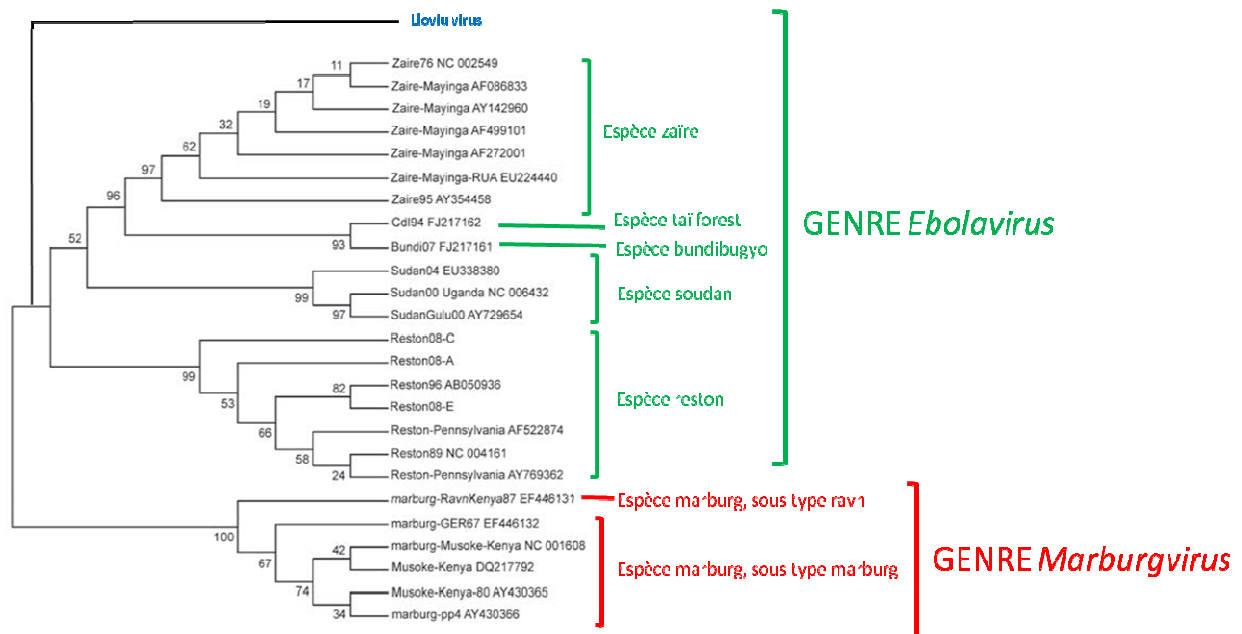


Figure 3: Arbre phylogénétique des Filovirus, adapté d'après Bardette et coll, Science, 2009. En rouge, les virus de du genre *Marburgvirus*, en Vert les virus du genre *Ebolavirus*, en bleu, le nouveau virus « Ebola-like », *Lloviu virus* [32].

2. Histoire Naturelle

i. Le schéma d'infection classique :

Compte-tenu du caractère hautement pathogène des Filovirus pour l'homme, de nombreuses études se sont attachées à identifier leur réservoir naturel, afin de pouvoir contrôler l'apparition de bouffées épidémiques [33-36]. Les singes, bien que premiers suspects, ont rapidement été discriminés dans la mesure où ils succombent eux-aussi à un syndrome de FHV lorsqu'ils sont infectés [37-39]. De même, une étude a identifié la présence d'ARN de Filovirus dans une carcasse de céphalophe (une famille d'Antilopes), dont la mort était inexpliquée [37, 40]. L'histoire naturelle de la transmission des Filovirus est représentée sur la **Figure 4**.

De l'ARN viral et des Antigènes du virus Ebola ont été retrouvés chez les espèces de chauves-souris *Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus*, et *Myonycteris torquata* [34]. Ensuite, MARV a été identifié chez d'autres chauves-souris, du genre *Rousettus aegyptiacus* [41]. Pourtant, bien que porteurs du virus, il semble que ces animaux ne soient pas malades, et sont par conséquent le réservoir présumé pour les Filovirus. Ces animaux sont des espèces protégées et difficiles à maintenir en captivité donc peu de données sont disponibles concernant la physiologie et la biologie cellulaire des chauves-souris. La compréhension des mécanismes de résistance de ces organismes face à la pathogénicité des Filovirus en est donc seulement à ses balbutiements. Récemment, une équipe en Allemagne a mis au point une lignée cellulaire dérivée de chauve-souris du genre *Rousettus aegyptiacus*, pouvant être infectée et répliquer le virus de Marburg. Ce système permettra certainement de mieux comprendre la persistance des Filovirus au sein de leur réservoir présumé [42].

Les chauves-souris porteuses des Filovirus seraient à l'origine de la contamination d'autres animaux. En effet, la salive, les urines et les fèces de ces animaux seraient chargés du virus, induisant sa

dispersion dans l'écosystème. Ainsi, des singes pourraient être contaminés, soit en mangeant des fruits souillés par les chauves-souris, soit par morsure directe de chauve-souris. Le singe tomberait alors malade, et contaminerait ses congénères, puisque ces animaux vivent en groupe, créant déjà une épidémie au niveau des singes. La contamination humaine apparaîtrait, soit de même que pour les singes, par ingestion de fruits ou de végétaux souillés par des chauves-souris, soit par consommation de viande de brousse contaminée. La chasse semble donc être un facteur important dans l'apparition de bouffées épidémiques à Filovirus. De plus, une contamination directe par les chauves-souris a été observée, notamment chez des mineurs [43, 44], qui travaillaient dans un site où la population de chauve-souris était très importante. De même, en 2008, 2 cas de FHV à MARV ont été recensés chez des touristes à la suite de la visite de la Python Cave, une grotte où sont présentes des colonies de chauve-souris du genre *Rousettus aegyptiacus*, démontrant la possibilité d'une contamination directe chauve-souris/homme [45, 46].

Enfin, la transmission inter-humaine dans les tribus, du fait des habitudes de vie, lors de rites funéraires, et lors de soins prodigués aux personnes malades, est très fréquente, provoquant parfois des épidémies massives [47].

ii. Le porc, un vecteur des Filovirus jusqu'ici ignoré ?

En 2008, aux Philippines, une étude a montré la présence de l'espèce Ebola Reston chez des porcs concomitamment infectés par le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (VSDRP) [15, 48]. Ces animaux souffraient d'un syndrome pulmonaire, très différent des fièvres hémorragiques virales que peut induire REBOV chez les singes. L'immunodépression liée à la co-infection par le VSDRP a d'abord été suspectée comme origine du développement de la maladie, aucune sensibilité des porcs pour les Filovirus n'ayant été rapportée auparavant. Toutefois, une étude plus récente a mis en évidence le caractère pathogène de l'espèce zaire du virus Ebola pour le porc [49]. L'infection expérimentale de ces animaux par le virus Ebola Zaïre conduit au développement d'un syndrome pulmonaire de même nature que celui observé sur le terrain en 2008. Bien qu'aucune donnée sur la pathogénicité du virus Ebola Reston chez des porcs sains ne soit disponible, il semble que leur sensibilité aux différentes espèces du virus Ebola puisse être mise en parallèle avec la susceptibilité de l'homme pour ces mêmes espèces.

Le contact étroit entre le porc et l'homme, la rupture avec l'histoire naturelle du virus REBOV qui était connue jusqu'ici, ainsi que les faibles connaissances quant à la nature de l'infection par le virus REBOV chez l'homme mettent en avant le danger potentiel lié à la transmission de ce virus à l'homme. En effet, bien que jusqu'à maintenant, le virus REBOV n'ait été responsable d'aucune maladie humaine rapportée, les seules personnes connues pour être infectées sont des hommes adultes en bonne santé. Chez des enfants en bas-âge, des femmes enceintes, des personnes âgées ou des personnes immuno-déprimées, l'infection par le virus Ebola Reston pourrait être pathologique.

De plus, lors de cet épisode, les fermiers se sont avérés être séropositifs pour REBOV, témoignant d'une transmission probable entre le porc et l'homme, mécanisme jusqu'ici ignoré. Au final, la présence de virus chez le porc, sa capacité à être transmis du porc à l'homme et la proximité de personnes dont le système immunitaire pourrait être défaillant, laisse craindre l'émergence d'une nouvelle flambée épidémique. En outre, le porc pourrait agir dans l'histoire naturelle des Filovirus comme un hôte intermédiaire chez lequel le virus serait amplifié et pourrait potentiellement subir des mutations le rendant plus pathogène.

Cette chaîne d'évènements n'est pas sans rappeler l'histoire naturelle du virus Nipah, un autre virus hautement pathogène retrouvé en Asie, et qui est responsable d'encéphalites graves. Ce virus a pour réservoir les chauves-souris du genre *Pteropus vampyrus* [50], qui sont présentes en Asie et sur une partie de l'Australie, notamment aux Philippines. Ce virus est également retrouvé chez le porc, et c'est le contact avec le porc qui serait à l'origine de certaines épidémies humaines [51].

Dans les deux cas, il faut donc considérer le porc comme un vecteur viral important, capable d'amplifier massivement le virus et de le transmettre à l'homme.

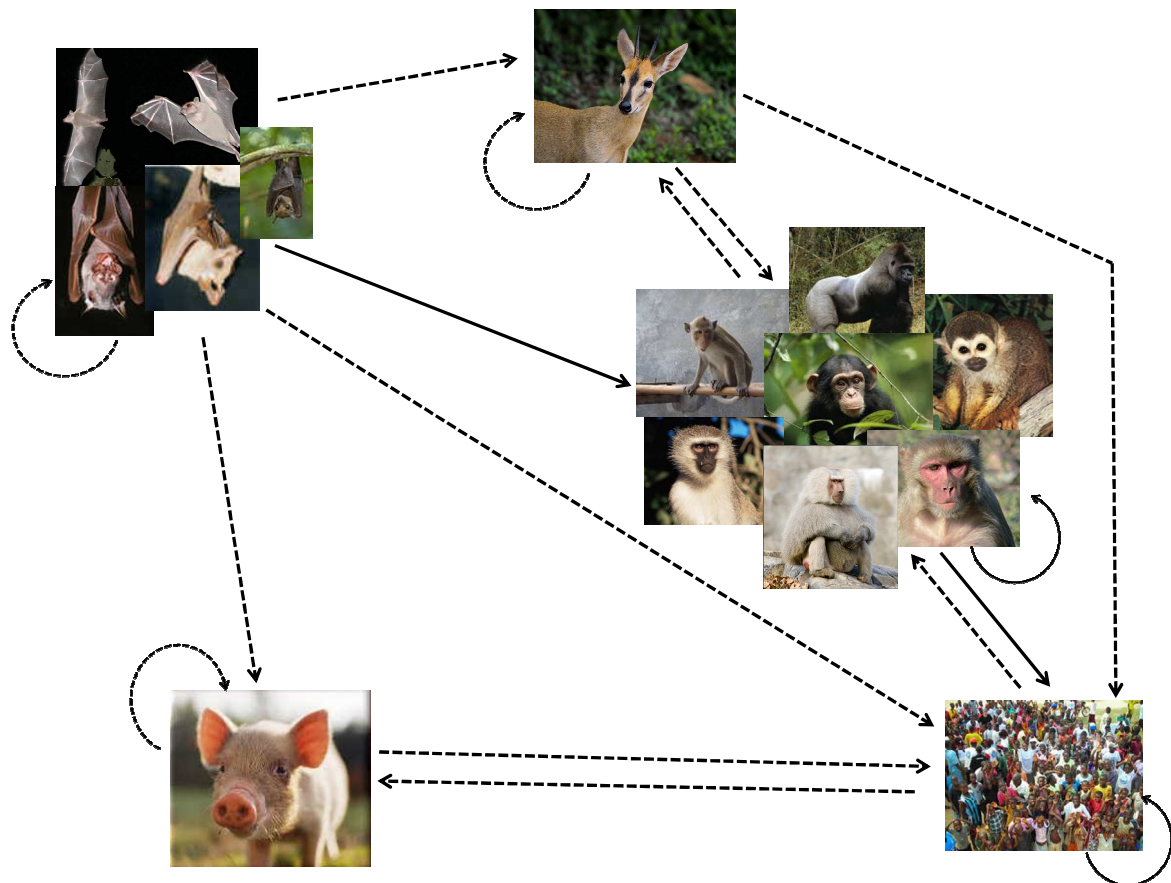


Figure 4: Histoire naturelle des Filovirus. Les lignes pleines représentent les voies de transmission avérées, tandis que les lignes pointillées représentent les voies de transmission suspectées.

iii. Multiplicité des lignées de Filovirus et persistance dans le réservoir

Dans les premiers épisodes de FHV à Filovirus, il était admis que l'épidémie était causée par une première infection « accidentelle » d'un homme (selon le schéma d'histoire naturelle présenté Figure 3), et que ce sujet infecté transmettait ensuite le virus par contacts rapprochés à ses proches, ainsi qu'au personnel soignant, ce dernier contaminant ensuite d'autres patients, etc. Pourtant l'étude réalisée au cours de l'épidémie à virus de Marburg au Congo en 1998 a révélé qu'au moins 9 souches du même virus, avec des séquences différentes, étaient identifiables [27] chez différents patients. L'enquête réalisée révèle plusieurs transmissions indépendantes depuis la grotte d'où semble avoir émergé le virus. Cette étude signifie donc que, pour une même flambée épidémique, différentes origines existent pour la contamination de l'homme. Par ailleurs, le séquençage des virus Ebola chez les grands singes (chimpanzés, gorilles) ayant succombé à l'infection montre que là encore, lors d'une

seule épidémie, plusieurs souches peuvent être incriminées [37, 52], ce qui reflète plusieurs infections depuis le réservoir vers les primates. De plus, la variabilité génétique des Filovirus semble faible. Ces informations sont donc en faveur d'une longue persistance de ces virus dans leur réservoir naturel, où le virus et l'hôte ont évolué ensemble, ce qui a conduit à l'apparition au fil du temps de souches différentes pour une même espèce virale, pour une même zone géographique, et finalement lors d'une même épidémie. Cette donnée importante complexifie d'autant la compréhension de l'apparition d'un épisode de FHV et son contrôle.

3. *Intégration de séquences génomiques des Filovirus chez certains vertébrés.*

La recherche des facteurs de résistance du réservoir des Filovirus présente un intérêt majeur à la fois pour comprendre l'histoire des Filovirus et leur co-évolution, mais également pour mettre en évidence les mécanismes qui permettent au réservoir de contenir la réplication à un niveau où le virus persiste mais n'est pas pathogène. Dans cette optique, deux études récentes ont réalisé des analyses génétiques sur les réservoirs potentiels des Filovirus [53, 54]. Ces études identifient, par deux techniques différentes d'alignements de séquences (BLAST et tBLASTn), la présence dans le génome de petits mammifères de séquences homologues à la séquence génomique des Filovirus. L'approche évolutionniste employée dans ces études montre que cette intégration daterait d'environ 40 millions d'années. Les divergences entre les séquences intégrées et les séquences connues de Filovirus ne permettent pas de savoir s'il s'agit d'un virus de Marburg ou d'un virus Ebola, laissant supposer que peut-être, il pourrait s'agir d'autres espèces de Filovirus non encore identifiées, ou bien d'un ancêtre commun aux Filovirus tels que nous les connaissons à l'heure actuelle.

Les séquences intégrées concernent : une partie de la séquence de la Nucléoprotéine (NP), une partie de la séquence de la Polymérase L, une partie de la séquence de la VP35, et enfin une partie de la séquence de la GP. Les Filovirus étant des virus à ARN, dont la réplication est strictement cytoplasmique, l'intégration d'une partie de leur génome dans des cellules germinales de mammifère est plus que surprenante. Les caractéristiques des séquences insérées (présence de codon initiateur, faibles répétitions et insertion possible de queue polyA) suggèrent une insertion à partir des ARN messagers viraux anciens, qui auraient subi une reverse-transcription, certainement par les éléments LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*). Un autre mécanisme proposé pour l'intégration de ces séquences serait la co-infection d'un hôte par un Filovirus et un Rétrovirus, qui aurait perduré assez longtemps pour avoir permis l'intégration d'une partie de l'information génétique des Filovirus par la Transcriptase Inverse rétrovirale.

Bien qu'intégrées depuis longtemps, ces séquences codantes semblent avoir été fortement conservées, comme en témoigne le faible taux d'apparition de codons STOP dans la séquence. En particulier, il a été démontré que des ESTs (*Expressed Sequence Tags*) spécifiques de ces séquences étaient présentes dans l'analyse transcriptomique des hôtes, suggérant très fortement l'expression d'ARN correspondant à ces séquences et/ou de fragments de protéines virales. Comme tenu du fait que ces séquences ont été retrouvées principalement dans des espèces mammifères qui ne développent pas de maladie suite à l'infection par un Filovirus, ces séquences pourraient conférer une protection des espèces concernées. Par exemple, les séquences de Nucléoprotéine retrouvées correspondent à un fragment de la NP situé en amino-terminal de la protéine, qui est connu pour être important dans l'interaction entre deux molécules de NP, et pour l'incorporation dans les particules virales. La synthèse d'une protéine proche de celle des Filovirus jouant cette fonction

pourrait conduire à son intégration dans la particule virale en cours de formation, et ainsi à la formation d'un virion non infectieux. De même, la portion de la protéine VP35 qui a été retrouvée chez une espèce de chauve souris, *Miyotis lucifugus*, correspond au domaine de cette protéine contenant à la fois sa région responsable de l'inhibition de la réponse Interféron (IFN) et la séquence d'oligomérisation et de liaison à l'ARN. Les mutations observées dans la version ancienne de cette séquence (c'est-à-dire la version intégrée dans le génome de l'hôte) sont responsables d'une diminution de la liaison de la VP35 à l'ARN viral. Dans ce contexte, l'expression de cette protéine pourrait conduire à la synthèse de particules virales dites défectives, c'est-à-dire induisant une réplication virale de mauvaise qualité. De la même façon, la protéine proche de la L-polymérase exprimée par les cellules de l'hôte pourrait être à l'origine de la formation de particules virales peu répliquatives, voire de l'apparition de mutations dans le génome viral. Enfin, la portion de GP2 exprimée chez certains mammifères pourrait induire un défaut de fonctionnement de la GP de surface, et par conséquent, provoquer la production d'une particule virale incapable d'infecter de nouvelles cellules.

Il semble donc que ces mécanismes d'intégration de séquence génétique de Filovirus aient permis aux hôtes de contrôler la réplication de ces virus, et ainsi d'empêcher qu'ils deviennent pathogènes. Le caractère indépendant de l'intégration de ces séquences dans différentes espèces de rongeurs est reflété par la variabilité de séquence et de site d'intégration dans le génome de l'hôte. En outre, il semble difficile de trouver chez le même animal la trace de deux événements d'intégration distincts, ce qui laisse supposer qu'un seul événement serait suffisant pour empêcher le développement de la pathologie. De façon intéressante, un mécanisme similaire a été mis en évidence pour les Bornavirus, une autre famille de *Mononegavirales*, mais dont la réplication virale a lieu au niveau du noyau [55].

Finalement, (i) le parallèle existant entre l'intégration de ces séquences et la capacité des porteurs de ces séquences à maintenir une réplication des virus sous le taux pathologique, (ii) la forte conservation de ces séquences parmi les espèces, (iii) le faible taux de mutations rencontré, et (iv) les événements multiples d'intégration observés pour un large panel de rongeurs démontrent que ces événements d'intégration de séquence d'ADN ancien proche des Filovirus auraient conféré un avantage aux animaux, qui serait la résistance au développement de la pathologie. La variété des rongeurs testés positifs pour ces séquences et leur distribution à la surface du globe laisse présumer l'existence de nombreux autres Filovirus. L'étude plus précise de ces séquences et la compréhension des mécanismes d'intégration permettra certainement d'identifier le réservoir des Filovirus de façon formelle et de mieux comprendre la coévolution réservoir-virus.

D. Physiopathologie de l'infection

1. *Tableau clinique : des signes non spécifiques*

La symptomatique des FH à Filovirus a fait l'objet de nombreux rapports [4, 56-60], et tous conduisent à la même conclusion : il est très difficile, compte tenu des symptômes précoces de la maladie, d'identifier une épidémie à Filovirus, et de prendre les mesures sanitaires qui s'imposent (Voir **Figure 5**).

Après une période d'incubation de 5 à 9 jours, mais pouvant parfois aller jusqu'à 21 jours [61], les patients souffrent tout d'abord de fortes fièvres, accompagnées de maux de tête et de douleurs musculaires et articulaires, faisant penser à une grippe. S'y associent également des douleurs abdominales ainsi qu'un état d'asthénie généralisé. On parle donc de « syndrome grippal ». Au bout de 3 à 4 jours, des symptômes digestifs apparaissent, nausées, vomissements, diarrhées et anorexie. C'est ainsi qu'en 1967, à Marburg, la première hypothèse médicale a été la Dysenterie ou la Fièvre Typhoïde. En même temps apparaissent des symptômes de conjonctivite, et des éruptions cutanées (exanthème) et muqueuses (éнанthème).

A la fin de la première semaine suivant l'apparition des symptômes, la fièvre a tendance à baisser, alors que se développent des Pétéchies et que les premiers signes hémorragiques apparaissent : saignements du nez, des yeux, de la bouche et des gencives, du vagin, sous cutanées (rash maculopapulaire), diarrhées et vomissements sanguinolents, et on retrouve également du sang dans les urines. Les analyses réalisées à ce stade de la maladie ont montré que, pour les cas fatals, le foie est détruit, en même temps que les anomalies de la formule sanguine sont relevées : forte hausse des polynucléaires neutrophiles, associées à une thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes), qui explique les hémorragies. Les hémorragies relatées sont en général impressionnantes, les patients étant décrits comme saignants par tous leurs orifices, y compris au niveau des sites de piqûre pour les prélèvements sanguins. La mort intervient en général entre le 7^{ème} et le 16^{ème} jour après le début des symptômes (11 à 37 jours après l'infection), soit suite à une défaillance multiorganique, soit suite à une hémorragie interne, ou encore par choc hypovolémique.

Dans les cas où les patients arrivent à résoudre l'infection, une forte hépatite est relatée, couplée à une Orchite (inflammation des testicules) et une Uvéite (inflammation oculaire). La persistance du virus dans le liquide séminal ainsi que dans la chambre antérieure de l'œil a été constatée jusqu'à plusieurs mois après l'infection. Par ailleurs, les patients qui ont été infectés gardent longtemps des taux d'IgM et d'IgG anti-Filovirus élevés dans le sérum.

Dans certains cas, le cerveau est atteint, comme en témoignent les épisodes de confusion mentale, de désorientation et les convulsions. Des troubles nerveux sont également reflétés par l'apparition de fourmillements, picotements et engourdissements.

Si ce n'est un hoquet persistant et une difficulté pour avaler [12], aucun symptôme ne permet d'anticiper l'issue de la maladie, les hémorragies étant présentes aussi bien dans les cas fatals que chez les personnes résolvant l'infection, et ce, chez environ la moitié des patients [62].

Mais cette symptomatique se restreint aux infections humaines. Bien que des données mettent en avant que les Filovirus induiraient le même tableau clinique chez les singes [63-66], la maladie

récemment décrite suite à l'infection de porcs par l'espèce reston du virus Ebola semble être différente. Ils développent un syndrome pulmonaire associé à des troubles respiratoires sévères. En fait, les poumons semblent se nécroser suite à l'infection, et en parallèle, des signes hémorragiques au niveau du cœur et une forte réponse inflammatoire sont rapportés. On peut donc supposer que naturellement, les Filovirus seraient à l'origine d'un syndrome pulmonaire chez le porc.

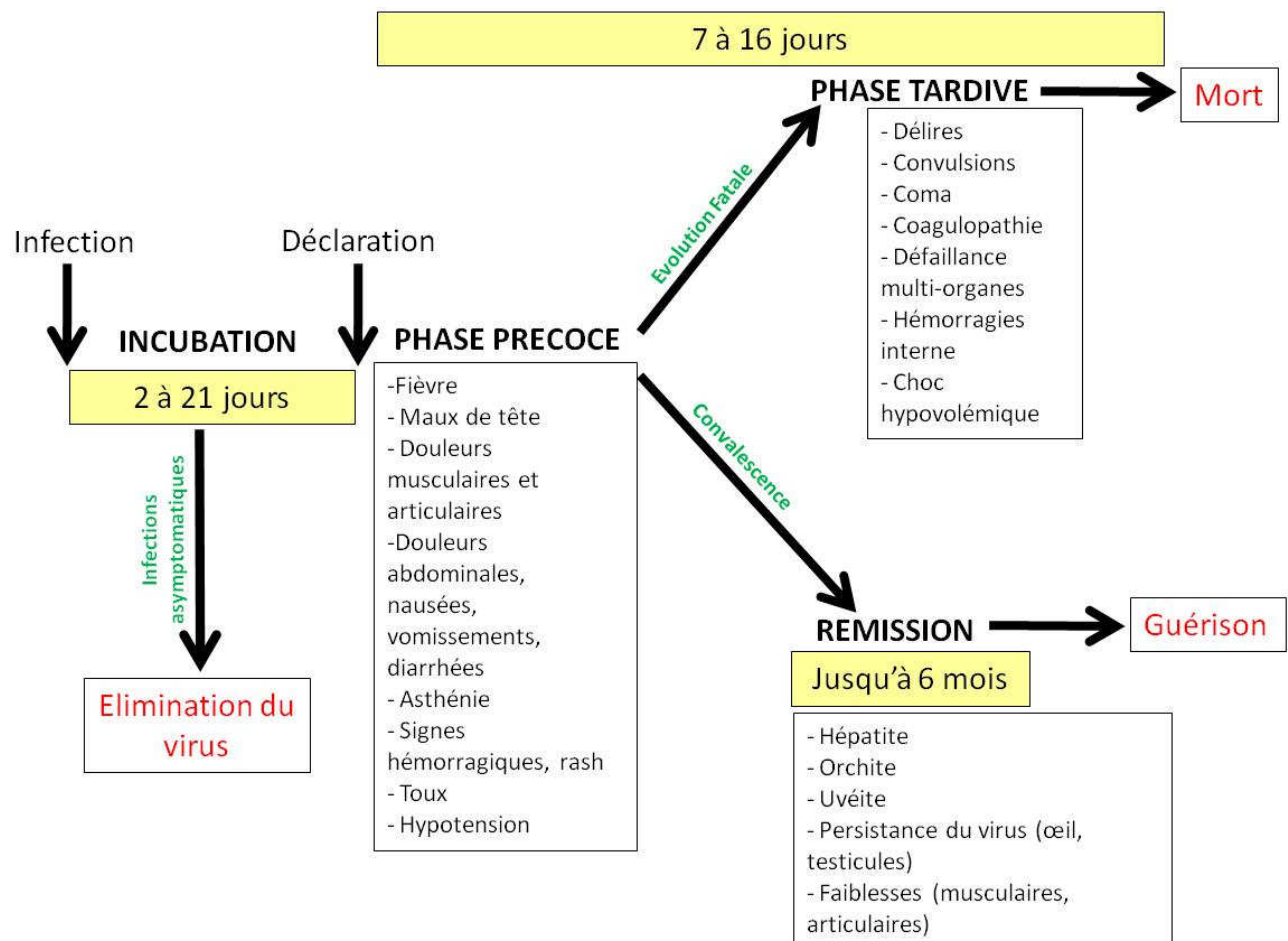


Figure 5: Tableau clinique des infections à Filovirus chez l'homme.

2. Pathogenèse induite par l'infection à Filovirus

Le développement de ces symptômes au cours de l'infection humaine à Filovirus est le résultat de nombreux dérèglement de la physiologie de l'hôte, notamment de son système immunitaire, comme nous allons le voir plus en détail dans la suite de cette étude. La pathogenèse a été massivement étudiée chez le modèle primate non humain. Par contre, les données concernant les mécanismes à l'origine du développement de FHV à Filovirus chez l'homme sont rares, et sont directement dépendantes des données collectées lors de bouffées épidémiques. Les experts ont divisé les dysfonctionnements à l'origine de la pathologie en deux groupes : ceux touchant directement les cellules infectées (cytotoxicité), et ceux liés à des désordres du système immunitaire inné (suppression de la réponse immunitaire innée, suppression de la réponse adaptative, apoptose

passive des lymphocytes, désordres hémorragiques). Un bilan des mécanismes de pathogenèse induite par les Filovirus est présenté **Figure 6**.

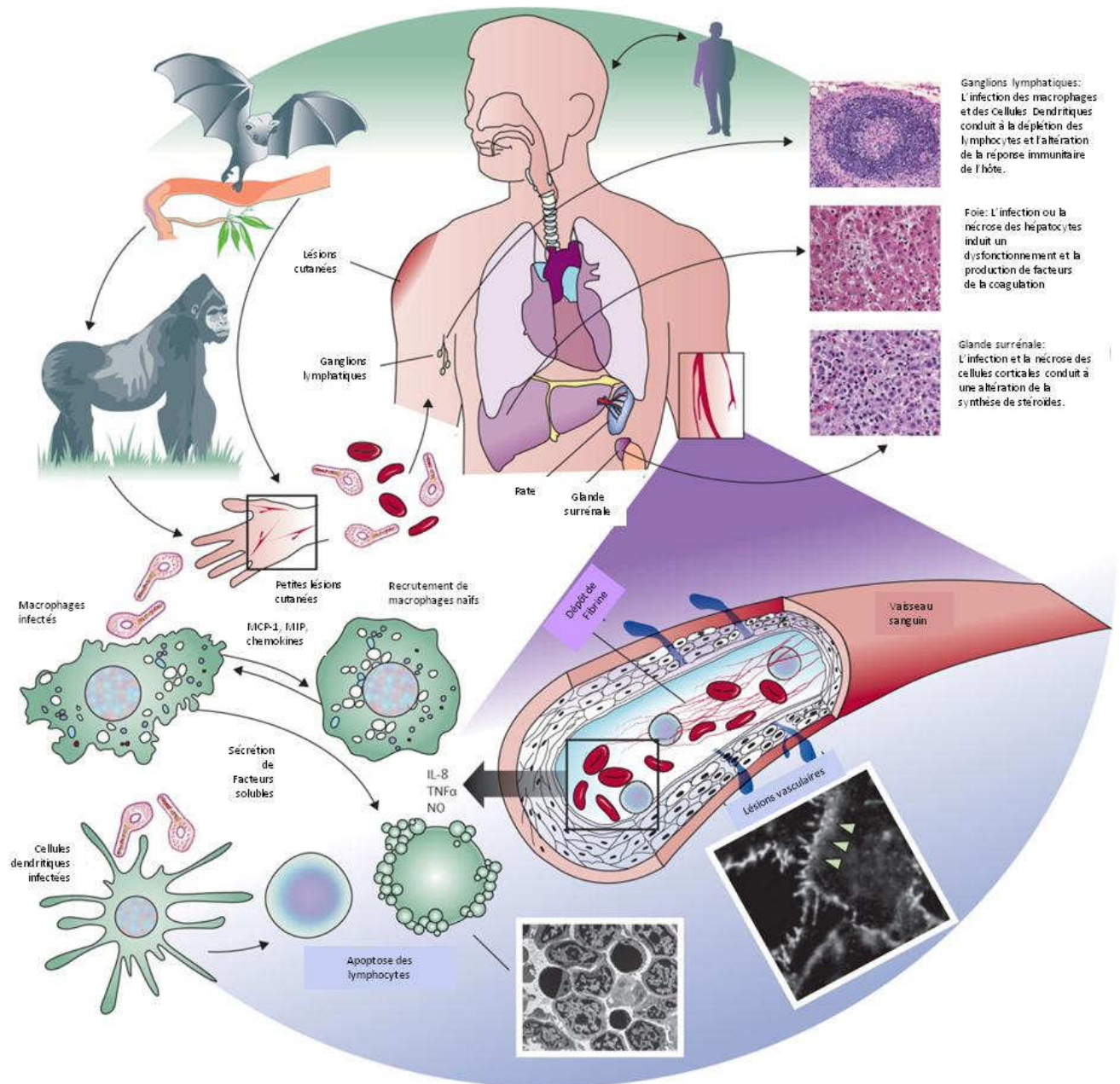


Figure 6: Schéma récapitulatif des événements de pathogenèse lors de l'infection par un Filovirus, traduit d'après [59].

i. Dissémination du virus dans l'organisme

La très haute pathogénicité des Filovirus est directement liée au tropisme cellulaire chez l'homme. Une fois entré dans l'organisme, le virus va cibler en premier lieu les Macrophages et les cellules Dendritiques (DCs pour *Dendritic Cells*), qui sont des cellules circulantes, et présentes à tous les points d'entrée des virus dans l'organisme (peau, plaies, muqueuses). Ces cellules infectées vont ensuite migrer jusqu'aux organes lymphoïdes primaires, tels que les ganglions lymphatiques, où le virus va se répliquer massivement. Les virus ainsi synthétisés seront disséminés dans tout

l'organisme *via* le système lymphatique et la circulation sanguine. En particulier, ces virions vont coloniser d'autres Macrophages et d'autres DCs, soit circulantes, soit fixées au niveau d'un organe, comme le foie ou la rate par exemple. La réplication virale dans différents organes va alors induire l'infection des cellules du parenchyme, telles que par exemple les hépatocytes ou les cellules corticales, ce qui induira une production massive de virions et une nécrose tissulaire. Dans les phases tardives, une infection des cellules endothéliales vasculaires a aussi été notée, bien qu'elle ne permette pas d'expliquer les troubles circulatoires caractéristiques d'une FHV [66].

ii. Effets sur la cellule infectée :

a. *Tropisme cellulaire*

Bien que le récepteur cellulaire des Filovirus reste inconnu à l'heure actuelle, des études récentes ont mis en évidence la capacité de la Glycoprotéine de surface (GP) à se lier à des molécules de type Lectines de type C [67] qui sont présentes à la surface de nombreuses cellules. Ceci pourrait expliquer la capacité des Filovirus à infecter un large panel de cellules, dont les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules corticales de la glande surrénale, et différents types de cellules épithéliales. Toutes ces cellules supportent par ailleurs la réplication virale, ce qui permet une large production de virus dans l'organisme. En particulier, la GP se lie à la protéine DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*) présente à la surface des Macrophages et des DCs [68]. Il est important de noter que la protéine DC-SIGN est impliquée dans l'adhésion cellulaire lors de l'activation des lymphocytes T par les DCs, et que par conséquent, une modification de cette protéine lors de sa liaison à la Glycoprotéine des Filovirus pourrait expliquer partiellement le défaut d'induction de réponse adaptative cellulaire. Par ailleurs, une molécule proche de DC-SIGN, dénommée DC-SIGNR, est présente à la surface des cellules endothéliales, et il semblerait que cette molécule permette aussi l'attachement des GP des Filovirus [69]. De manière intéressante, l'emploi d'anticorps anti-Lectine de type C, spécifique des macrophages, a démontré une diminution de la réplication du virus Ebola zaïre et mis en lumière la protéine L-SIGN comme médiateur possible de l'infection [67]. Toutefois une étude récente [70] a montré que ces molécules n'étaient pas suffisantes pour permettre l'infection réelle et complète (définie par l'attachement, mais également l'internalisation et la fusion des vésicules), laissant supposer que d'autres molécules seraient importantes pour l'internalisation et l'initiation de la réplication des Filovirus. En particulier le facteur cellulaire TIM-1 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1*) a récemment été identifié comme récepteur pour EBOV et MARV [71], bien qu'il ne soit pas présent à la surface de toutes les cellules infectées par les Filovirus, et que, au contraire, il soit exprimé dans des cellules qui ne supportent pas la réplication virale, comme les Lymphocytes Th2 par exemple. La compréhension des troubles pathologiques liés à l'infection par les Filovirus nécessite une identification stricte des cellules de l'organisme qui sont ciblées. A ce titre, l'identification de toutes les molécules impliquées dans l'entrée des Filovirus est indispensable.

b. *Effets cytopathiques viraux*

Les études *in vitro* ont montré que la GP, que ce soit sous forme attachée au virion, ou sous forme soluble, était à l'origine d'un arrondissement des cellules et de leur détachement du tapis cellulaire [72]. Ces propriétés cytopathiques ont été supposées responsables de la perte de l'intégrité vasculaire, et donc à l'origine des syndromes hémorragiques. Par ailleurs, une autre étude a caractérisé le domaine de la Glycoprotéine du virus Ebola responsable de cet effet : il s'agissait du domaine MUCIN-like [73], un domaine qui diffère entre la GP du virus Ebola et celle du virus

Marburg, laissant donc supposer que cet effet cytopathique, d'origine intracellulaire, ne serait observé que pour le virus Ebola et pas pour le virus de Marburg [74]. Toutefois, les travaux de notre laboratoire sont venus tempérer ces informations : Alazard et coll ont en effet montré que l'expression modérée de la GP du virus Ebola, telle qu'elle peut être observée dans les phases précoces de la réplication virale, n'était pas cytotoxique [75]. La GP peut également se lier au TLR4 (Toll-Like Receptor 4), une molécule impliquée dans la reconnaissance des éléments étrangers à la cellule, ce qui conduit à l'expression de NFκB, lui-même à l'origine d'une forte réponse inflammatoire, ce qui pourrait conduire à la mort cellulaire [76].

Finalement, les données cristallographiques concernant la GP du virus Ebola ont mis en évidence un repliement du domaine transmembranaire de la GP dans une structure secondaire en épingle à cheveux [77], qui serait insérée directement dans la membrane cellulaire et conduirait ainsi à une toxicité directe pour la cellule, par opposition au modèle où la GP serait attachée à une protéine membranaire de la cellule. Les données moléculaires obtenues par Génétique Inverse tendent à confirmer cette hypothèse : un virus mutant chez qui le domaine d'édition avait été supprimé s'est révélé être beaucoup plus cytotoxique [78], bien que les quantités de virus relâchées dans le milieu aient été plus faibles, peut être en raison de la mort précoce des cellules infectées. La suppression du domaine d'édition du gène de la GP a induit la disparition de la forme soluble de la GP, et par conséquent, une augmentation de la quantité de GP de surface.

iii. Dérégulation du système immunitaire de l'hôte

a. *Suppression de la réponse immunitaire innée*

◆ *Mécanismes cellulaires*

Les principales cellules qui gouvernent l'immunité innée sont les cellules dendritiques et les macrophages. L'analyse de la réponse des DCs à l'infection virale a été largement étudiée, et la fonction de ces cellules est largement affectée par les Filovirus. Il a été montré que l'infection de ces cellules par les Filovirus les rend incapables d'atteindre un stade mature indispensable pour la présentation correcte d'antigène aux cellules T [79, 80]. Par ailleurs, les DCs infectées ne peuvent pas produire de cytokines pro-inflammatoires, qui sont aussi requises pour la mise en action de la réponse immunitaire médiée par les cellules T.

A contrario, les monocytes et les macrophages infectés vont relâcher de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*), l'IL-6 (*Interleukine 6*), MCP-1 (*Macrophage Chemoattractant Protein 1*), MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Protein 1*). Ces cytokines seront responsables du recrutement de nouveaux macrophages naïfs qui seront infectés à leur tour. Par ailleurs, les Macrophages vont sécréter le Facteur Tissulaire qui induira des troubles de la coagulation.

Les cellules NK (*Natural Killer*) sont des cellules issues de la lignée lymphoïde dont le rôle est de libérer des molécules cytotoxiques pour induire la mort cellulaire de cibles infectées, notamment dans le cas d'infection virales. Au cours d'une infection par les Filovirus, ces cellules disparaissent massivement [65], comme les autres cellules de la lignée lymphocytaire. Cette disparition semble causée par une apoptose massive de ces cellules, comme en témoigne la forte activité de la voie des caspases. Cette déplétion sera un obstacle de plus pour le montage d'une réponse innée efficace au cours de l'infection par les Filovirus.

Enfin, il a été mis en évidence que les Neutrophiles, bien que non infectés par les Filovirus, voyaient une perte de leurs molécules de surface, comme par exemple le facteur TREM-1 (Trigger Receptor Expressed on Myeloid Cell-1) [81]. Cet événement active les neutrophiles qui vont libérer dans le milieu des granules préformés, toxiques pour les cellules avoisinantes, ainsi que des molécules pro-inflammatoires, et des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

◆ Mécanismes moléculaires

L'utilisation du modèle souris a mis en évidence l'importance de la voie Interféron de type 1 dans le contrôle de l'infection par les Filovirus. En effet, alors que les souris sauvages ne sont pas sensibles à l'infection, l'utilisation d'anticorps anti-IFN α ou de souris dont le récepteur à l'IFN de type 1 (IFNAR) n'est pas fonctionnel (IFNAR^{-/-}) [82], ou encore de souris dont STAT1 (*Signal Transducer of Activator of Transcription 1*) n'est pas exprimé (STAT1^{-/-}) [82] rend ces animaux susceptibles à l'infection. Par ailleurs, il a été montré qu'*in vitro*, la synthèse d'IFN de type 1 en réponse à l'infection par les Filovirus était bloquée, alors qu'*in vivo*, des taux d'IFN élevés ont été remarqués dans le sang pendant la phase aiguë de l'infection [83]. La voie de signalisation conduisant, *via* la synthèse d'IFN, à l'établissement d'un état antiviral, est présentée **Figure 7**, et son mode de fonctionnement a été décrit par ailleurs (pour revue voir [84, 85]. Les analyses moléculaires des protéines des Filovirus ont mis en évidence que les protéines VP35 et VP24 du virus Ebola et que la protéine VP40 du virus de Marburg étaient à l'origine de blocage de la voie de l'IFN de type 1 (**Figure 7**).

Blocage de la voie IFN type I par les protéines VP24 et VP35 du virus Ebola

Des études *in vitro* ont mis en évidence une importante dérégulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte. En particulier, la synthèse d'IFN α par les Macrophages est très faible dans les phases tardives de l'infection [79], de même que la réponse à une stimulation par un ARN double brin (poly I :C) est empêchée par la présence du virus Ebola [86]. Il est maintenant clairement établi que c'est la protéine VP35 du virus Ebola qui est à l'origine de cette inhibition, puisqu'elle est capable de compléter un virus de la grippe dont la fonction anti-IFN α a été abolie [87]. L'importance de la protéine VP35 du virus Ebola dans le contournement de la réponse immunitaire innée a ensuite été étudiée de façon extensive, et les données obtenues montrent que cette protéine agit de différentes façons pour bloquer la réponse IFN : elle bloque la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur IRF-3 (*IFN response Factor 3*) [88] ; elle est également à l'origine d'un blocage de l'action de la PKR (*Protein Kinase RNA activated*) [89, 90], une molécule à la fois activatrice et effectrice de la voie IFN, dont la phosphorylation conduit à la phosphorylation du facteur eIF-2 α , ce qui induit un arrêt de la traduction dans la cellule. En ce sens, en bloquant l'action de la PKR, la protéine VP35 permet la synthèse des protéines virales et donc la réplication virale, en plus de bloquer l'activation de la synthèse d'IFN. Une des caractéristiques importantes des virus à ARN est l'ARN double brin qui est formé au cours du cycle réplcatif viral, et qui n'existe pas dans la cellule non-infectée. Il existe donc des hélicases cellulaires, RIG-I (*Retinoic Acid Inducible Gene 1*) et RLRs (*RIG-1 Like Receptors*), capables de reconnaître cet ARN double brin, et d'activer en réponse la synthèse d'IFN de type 1. La protéine VP35 est capable d'inhiber la reconnaissance de l'ARN double brin par ces capteurs cytoplasmiques [91, 92], en mimant l'action de ces capteurs, c'est-à-dire en coiffant l'extrémité de l'ARN double brin viral. Ainsi, la voie IFN ne peut être activée par ces capteurs. De plus, la protéine VP35 est également à l'origine de la SUMOylation de IRF-7, médiée par PIAS1 (Protein Inhibitor of activated STAT1) [93], ce qui résulte en une diminution du taux d'expression des molécules IFN de type 1. Enfin, l'induction de la synthèse d'IFN est encore bloquée par la protéine VP35 du virus Ebola

qui est capable de cibler les facteurs IKK ϵ et TBK-1, qui induisent la phosphorylation de IRF3 et IRF7, une étape clé de l'activation de la synthèse d'IFN de type 1 [94].

En outre, des travaux ont mis évidence une action de la protéine VP24 du virus Ebola sur la voie de réponse à l'IFN de type 1. En effet, cette protéine, en se liant aux Karyophérines alpha 1, 5 et 6, est capable de bloquer la translocation nucléaire des protéines STAT1 et STAT2 [95-97]. Comme leurs noms l'indiquent, les protéines de la famille STAT sont des facteurs de transcription, et STAT1 et STAT2 activent l'expression de gènes sous le contrôle du promoteur ISRE (*IFN-stimulated Response Element*), qui vont induire la synthèse de protéines effectrices de la voie IFN, telles que les molécules Mx, la PKR et les 2'-5' OAS (2'-5' oligoadénylate synthetases) (pour revue, voir [98]). Au final, l'action de la protéine VP24, en empêchant l'action des facteurs de transcription STAT1 et STAT2, prévient la synthèse de ces protéines antivirales, et donc l'inhibition du cycle réplcatif viral.

Blocage de la voie IFN de type I dans le cas d'infection à virus de Marburg.

L'inhibition de la voie IFN par la protéine VP35 du virus de Marburg n'est pas clairement établie, mais a été suggérée par le passé [61, 99].

Par contre, concernant le blocage de la synthèse de protéines antivirales dont l'expression est dépendante de l'IFN, une activité analogue à celle de la protéine VP24 du virus Ebola est jouée par la protéine VP40 du virus de Marburg. En effet, la protéine VP40 est aussi responsable d'un arrêt de la cascade de signalisation activée par l'IFN, puisqu'elle empêche la phosphorylation des résidus Tyrosine de la kinase JAK-1 (Janus Kinase 1) [29, 100]. La protéine Jak est une kinase cytoplasmique, qui est phosphorylée lorsque l'IFN se lie au récepteur IFNAR à la surface cellulaire. Le blocage de sa phosphorylation l'empêchera d'exercer son activité kinase, et donc de phosphoryler les facteurs STAT1 et STAT2, résultant en l'inhibition de la synthèse des protéines à activité antivirale, et au final en l'échappement du virus de Marburg au contrôle par la voie de l'IFN.

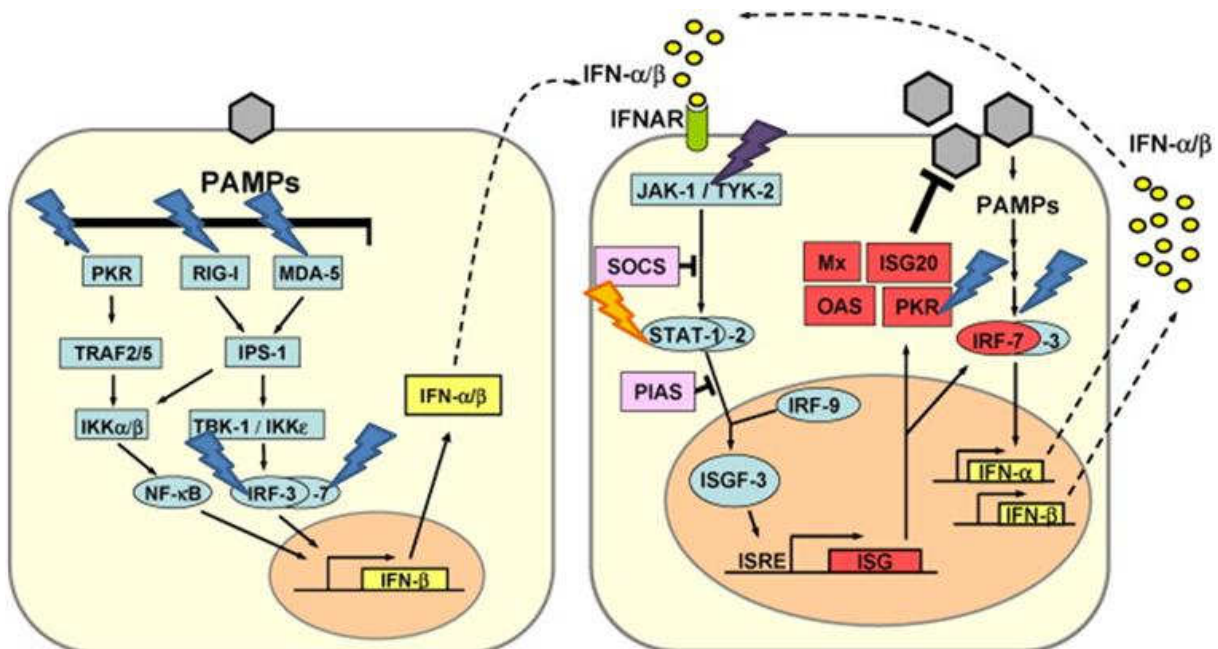


Figure 7: Modulation de la réponse IFN de type 1 par les protéines des Filovirus. Adapté d'après [85]. Les éclairs bleus représentent les actions de la protéine VP35 du virus Ebola, l'éclair orange l'action de la protéine VP24 du virus Ebola, et l'éclair violet l'action de la VP40 du virus Marburg.

Ciblage de la réponse ARN interférent antivirale

La présence dans la cellule d'ARN double brin au cours de l'infection virale est définie comme un PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), soit une caractéristique associée à la présence d'un pathogène. La reconnaissance de ce PAMP dépend de plusieurs mécanismes, comme nous venons de le voir (reconnaissance par des molécules de type RIG1, RLR et MDA5 pour activer la voie IFN), mais également la voie de l'ARN interférent, un autre mécanisme de défense antivirale (pour revue sur l'ARN interférent et les mécanismes moléculaires antiviraux, voir [101]). Une étude récente a montré que les protéines VP30, VP40 et VP35 du virus Ebola ont des propriétés suppressives de l'activité des ARN interférents antiviraux [102], et sont donc définies comme des SRS (*Suppressor of RNA silencing*). La protéine VP30 interagit avec Dicer, de manière indépendante des siRNA, et avec TRBP seulement en présence des siRNA. La protéine VP35 interagit directement avec les protéines TRBP et PACT, qui sont des partenaires de Dicer (indépendamment des siRNA). Le mode d'action de la protéine VP40 n'est pas connu à l'heure actuelle, mais semble différent. On peut donc y voir une duplication de fonction, reflétant l'importance pour le virus d'échapper à ce mécanisme. Les études futures permettront certainement de mieux caractériser ce nouveau phénomène d'échappement, et d'analyser les mêmes propriétés au cours de l'infection par le virus de Marburg.

b. Modifications des réponses adaptatives

Les Filovirus, en raison de leur capacité à infecter les cellules présentatrices d'Antigène dites professionnelles (Macrophages et DC), sont à l'origine à la fois d'une dérégulation de la réponse immunitaire innée, mais également d'un défaut de mise en place de réponse adaptative. En effet, l'infection de ces cellules par les Filovirus induit un défaut de synthèse des molécules stimulatrices de la réponse adaptative, telles que les molécules CD40, CD80 et CD86 à la surface des DCs, ce qui bloque la mise en place d'une réponse lymphocytaire efficace [79, 80]. Par ailleurs, une apoptose massive des lymphocytes qui a été rapportée [103, 104] semble indiquer que les Filovirus sont à l'origine d'une inhibition totale des réponses immunitaires de l'homme et des primates.

De plus, les taux élevés d'IFN γ plasmatiques retrouvés au cours de l'infection par les Filovirus pourraient être délétères pour les cibles de cette cytokine, comme notamment les lymphocytes T CD8+. En effet, il est établi que de trop fortes concentrations d'IFN γ induisent une contraction de cette population cellulaire et l'apoptose [105]. De la même façon, les autres cytokines pro-inflammatoires qui sont synthétisées massivement lors de l'infection pourraient être à l'origine d'effets néfastes pour le montage d'une réponse adaptative efficace, et résulter en la contraction des populations lymphocytaires. Paradoxalement, une étude réalisée avec le virus Ebola adapté à la souris met en évidence une augmentation du pourcentage de lymphocytes CD4+ et CD8+ qui expriment des taux élevés de CD44 [106], dans les phases tardives de l'infection (Jour 7). Le marqueur CD44 témoigne de l'activation et de la maturation des lymphocytes. Ces résultats semblent signifier que la mise en place d'une réponse adaptative chez l'hôte qui succombe à l'infection par Ebola arrive tardivement, après que les lymphocytes aient subi une apoptose massive, et en parallèle avec la chute de température rapportée juste avant le décès. Ces résultats laissent espérer qu'une stratégie thérapeutique visant à augmenter la réponse lymphocytaire, couplée à son induction plus précoce, pourrait permettre de résoudre l'infection et ainsi de diminuer le nombre de cas fatals.

Des différences notables sur l'activité des Lymphocytes B ont été rapportées, et semblent déterminer le caractère fatal ou non de l'infection : alors que chez les survivants, les Immunoglobulines M

spécifiques apparaissent dès le 2^{ème} jour après le début des symptômes, seulement dans 30% des cas fatals, des taux d'Ig M faibles sont retrouvés, et le reste du temps, elles ne sont pas présentes. De même des Immunoglobulines de type G (IgG) sont retrouvées entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour après le début des symptômes chez les survivants, alors qu'elles ne sont jamais présentes dans les cas fatals [103, 107].

c. Apoptose « passive » des lymphocytes

Bien que les Filovirus ne soient pas capables d'infecter les lymphocytes, une apoptose massive de ces cellules, expliquant la difficulté à monter une réponse immunitaire adaptative, a été rapportée lors de l'infection à Filovirus [65]. Cette apoptose semble causée par la présence de signaux de mort cellulaire (TRAIL : *TNF α -related apoptosis, inducing ligand*, FAS : *Fas-associated death protein domain*). De manière intéressante, la régulation de cette apoptose peut apparaître à partir du 4^{ème} jour dans le modèle primate [108], par l'augmentation du facteur de survie Bcl2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette apoptose passive des lymphocytes ne sont pas clairement connus à l'heure actuelle, mais il semble que la synthèse anormale de médiateurs par les cellules dendritiques et les macrophages infectés (Monoxyde d'Azote : NO, TNF α) pourrait expliquer ce phénomène. En outre, il se peut aussi qu'un attachement direct des particules virales à la surface des lymphocytes explique la perte de leur fonction.

Ce phénomène d'apoptose a également été rapporté dans les cas d'infection humaine par les Filovirus [103, 109] et les auteurs supposent que l'induction de la mort des lymphocytes serait associée avec un mauvais pronostic de cette maladie, puisque des marqueurs sanguins de l'apoptose sont retrouvés dans le sang des sujets qui ne survivent pas à l'infection.

Quel que soit le mécanisme moléculaire pour expliquer ce phénomène, l'apoptose lymphocytaire semble être l'obstacle majeur au montage d'une réponse immunitaire adaptative contre les Filovirus. La suppression de la réponse immunitaire qui en résulte a été proposée comme un des mécanismes initiateurs du choc septique [110, 111], dans le cas notamment des infections bactériennes. La mise au point de modèles animaux pour lesquels la pathologie développée est identique, et en particulier chez qui l'infection par les Filovirus induit également une apoptose des lymphocytes [112] permettra certainement de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et immunologiques à l'origine de cet évènement clé pour le devenir des sujets infectés.

d. Choc septique

Le choc septique s'explique par deux phénomènes distincts, d'une part une hypotension générale, couplée à une défaillance de la perméabilité vasculaire, et d'autre part des troubles de la coagulation (Coagulation Intravasculaire Disséminée : CIVD).

Pendant longtemps, les problèmes circulatoires conséquents à l'infection par un Filovirus étaient expliqués par la lyse des cellules endothéliales vasculaires [113, 114]. Pourtant, des études plus récentes ont mis en évidence d'autres mécanismes. Ainsi, l'hypotension et l'augmentation de la perméabilité vasculaire sont causées par la libération dans le milieu de médiateurs de l'inflammation, tels que NO, qui induit une perte de la tonicité vasculaire, lors de l'infection par EBOV. D'autre part, dans le cas d'infection par à EBOV ou MARV, la libération de cytokines pro-inflammatoires, et notamment le TNF α , augmente la perméabilité membranaire ; tous ces mécanismes conduisant à un blocage de l'homéostasie des vaisseaux sanguins et aux troubles hémorragiques symptomatiques de l'infection à Filovirus.

En particulier, la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été rapportée dans les cas de FH à virus Ebola, pour les espèces Zaïre et Soudan [115, 116], ainsi que chez les primates expérimentalement infectés [83]. Notamment, il semblerait que l'augmentation du taux de NO sanguin soit signe d'un mauvais pronostic, ce facteur étant associé à différents troubles : apoptose des lymphocytes, dommages tissulaires, perte de l'intégrité vasculaire, et hypotension. Tous ces symptômes sont responsables du choc provoqué par l'infection à Filovirus. Dans ce contexte, des travaux futurs sur la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de la très forte libération d'ERO au cours de l'infection par le virus Ebola permettront peut être de mettre en place des stratégies thérapeutiques qui permettront de diminuer la quantité de monoxyde d'Azote dans le sang, et ainsi d'améliorer le devenir des sujets infectés.

Par ailleurs, la CIVD semble trouver son origine dans la libération massive de Facteur Tissulaire par les macrophages. Ce facteur est à l'origine de la cascade de coagulation nécessaire pour arrêter les saignements lors de blessures. Lors de l'infection par Ebola, le Facteur Tissulaire, normalement présent en surface des macrophages, se retrouve libre dans la circulation, soit suite à la stimulation de Macrophages non infectés par des cytokines circulantes, telles que le $TNF\alpha$ par exemple ; soit encore est libéré avec des microparticules générées par les macrophages et se retrouve ainsi dans le plasma [117]. De façon intéressante, le traitement avec un inhibiteur du facteur VII (impliqué dans la cascade de coagulation initiée par la libération du facteur tissulaire) a permis d'observer la survie d'un tiers des animaux traités [118] dans le contexte d'une infection par EBOV. De plus, la caractérisation de la réponse immunitaire de ces animaux a mis en avant une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 et le MCP-1, couplé à une diminution du titre infectieux. Au final, ces résultats mettent en évidence l'inter-relation entre la dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte et les troubles vasculaires au cours des infections à Filovirus.

iv. Cas des Infections asymptomatiques

Des cas d'infections asymptomatiques par le virus Ebola ont été rapportés. Le système immunitaire de l'hôte semble alors prendre le pas sur la réplication virale, empêchant ainsi le développement de la FH, tout en laissant le virus se répliquer, comme en témoigne la détection de l'ARN viral [119]. Ainsi, une réponse inflammatoire rapide (jour 1 à jour 7 après l'exposition au virus), caractérisée par des taux élevés d'IL1 β (Interleukine 1beta), de $TNF\alpha$, d'IL6 est observée. Cette réponse est suivie par une réponse humorale robuste, comme en témoigne la synthèse d'Immunoglobulines M (IgM), puis d'Immunoglobulines G (IgG), dirigées contre la nucléoprotéine et la protéine VP40 du virus Ebola [119], 2 à 3 semaines après l'exposition au virus. L'apparition de ces Immunoglobulines est concomitante à la disparition du génome viral (détecté par RT-PCR nichée). Une étude plus approfondie des marqueurs immunologiques de ces personnes infectées mais non malades a mis en évidence qu'au cours de l'infection, les lymphocytes T étaient activés, et en particulier qu'une réponse cytotoxique (caractérisée par la synthèse d'Interféron gamma, de FasL, et de Perforine) était observée [120]. Au final, chez ces patients asymptomatiques, la réponse immunitaire développée est normale. Tout se passe donc comme si le virus ne pouvait pas mettre en place de contre-mesures pour empêcher cette réponse immunitaire.

E. Données Moléculaires

1. Le virion

Les premières observations de MARV en microscopie électronique [121] ont révélé des similitudes entre sa structure et celle des Rhabdovirus. Les particules virales des Filovirus sont de forme cylindrique, ont un diamètre de 80nm, et une longueur variable pouvant parfois atteindre 1,5 μm . C'est cette structure filamenteuse qui leur donna leur nom, du latin *Filum*, le fil. Ces virus sont pléiomorphes : ils peuvent être droits ou incurvés, et certaines photos de microscopie électronique ont montré leur capacité à faire des branchements [61]. Une étude visant à d'identifier des différences morphologiques entre les virus Ebola et Marburg, révèle que le virus de Marburg aurait plutôt une structure circulaire, tandis que le virus Ebola serait plutôt en forme de U ou de 6 [122]. L'organisation des éléments constitutifs du virion reste néanmoins conservée entre les virus Ebola et Marburg. Les virions sont enveloppés par une bicouche lipidique issue de la membrane plasmique cellulaire, dans laquelle sont enchâssés des spicules de 10 nm de hauteur, les Glycoprotéines (GP) [123-125]. Cette membrane recouvre une matrice, constituée de l'assemblage de deux protéines virales différentes, les VP24 et VP40, qui donne la forme au virus, et protège la Ribonucléoparticule (RNP) [124-126]. La RNP est constituée de l'ensemble ARN entouré de la nucléoprotéine (NP) et des protéines formant le complexe de réplication : polymérase L, VP30 et VP35. C'est une structure hélicoïdale [127], striée, de 50nm de diamètre (Voir **Figure 8**). Au total, les Filovirus sont composés de 7 protéines structurales différentes (VP pour Viral Protein), qui sont nommées en fonction de leur poids moléculaire ou de leur position dans le virion.

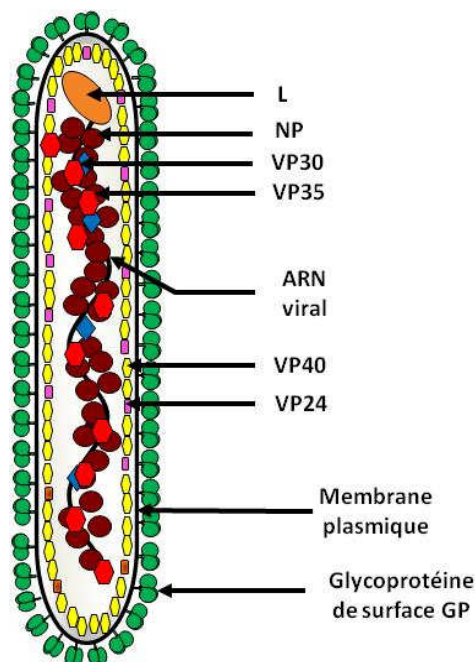


Figure 8: Structure de la particule virale.

i. Composition de la RiboNucléoParticule (RNP)

a. *L'information génétique*

♦ *Organisation du génome*

Le génome des Filovirus est encodé par un ARN simple brin de polarité négative, linéaire, non segmenté d'une longueur de 18959 et 19104 bases, pour Ebola et Marburg, respectivement. Il représente 1,1% du poids du virion. Bien que l'organisation génomique soit conservée au sein des Mononegavirales (ordre des gènes : *n-p-m-g-l*), le génome des Filovirus est de loin le plus long, en raison de la présence de séquences intergéniques et de l'existence de 2 gènes qui n'ont pas d'équivalent chez les autres Mononegavirales : *VP24* et *VP30*.

Le génome des Filovirus est organisé de la façon suivante : 3' « leader »- *NP-VP35-VP40-GP/sGP-VP30-VP24-L*-5' « trailer » (voir **Figure 9**). Généralement, les gènes sont séparés par de courtes séquences intergéniques, composées de 3 à 7 nucléotides. Toutefois, ces régions peuvent être plus longues, et c'est le cas entre le gène de la *VP30* et de la *VP24* du virus Ebola Zaïre (142 nucléotides), ainsi qu'entre le gène de la *GP* et de la *VP30* du virus de Marburg (126 nucléotides) [128]. A l'opposé, un chevauchement des gènes sur 5 nucléotides a été rapporté entre les gènes *VP35* et *VP40*, *GP* et *VP30* et *VP24* et *L* pour le virus Ebola (avec des variations inter-espèces [129-131], et entre les séquences *VP30* et *VP24* pour le virus Marburg. Ces régions chevauchantes sont considérées pour la classification des virus en différentes espèces.

♦ *Séquences Leader et Trailer*

Le génome débute par une région promotrice, non codante, appelée région « Leader » en 3'. Cette région, constituée de 30 à 70 nucléotides, sert de promoteur à l'initiation de la transcription. Elle semble se conformer en structure en « épingle à cheveux » [132], en raison de complémentarité de séquences. En 5' le génome se termine par une région dite « trailer », dont la longueur est très variable : 25 nucléotides pour l'espèce Reston du virus Ebola, et pouvant aller jusqu'à 677 nucléotides pour l'espèce Zaïre. Cette séquence est nécessaire pour la réplication virale, et la synthèse de nouveaux génomes. Il semble donc que ces régions aient un rôle régulateur pour les étapes de réplication et de transcription virale.

Ces deux séquences sont bien conservées dans l'ordre des Mononegavirales, et elles contiennent des signaux d'encapsidation [133] du génome. Des études ont mis en avant une auto-complémentarité en les 13 premiers et les 13 derniers nucléotides du génome du virus Ebola, laissant suggérer une possible association en « épingle à cheveux ». Le rôle de cette structure n'est pas connu à l'heure actuelle, puisque des études de mutagenèse ont montré, dans un minigénome, qu'elle n'était pas indispensable aux interactions entre l'ARN génomique et les protéines virales [129, 134-136].

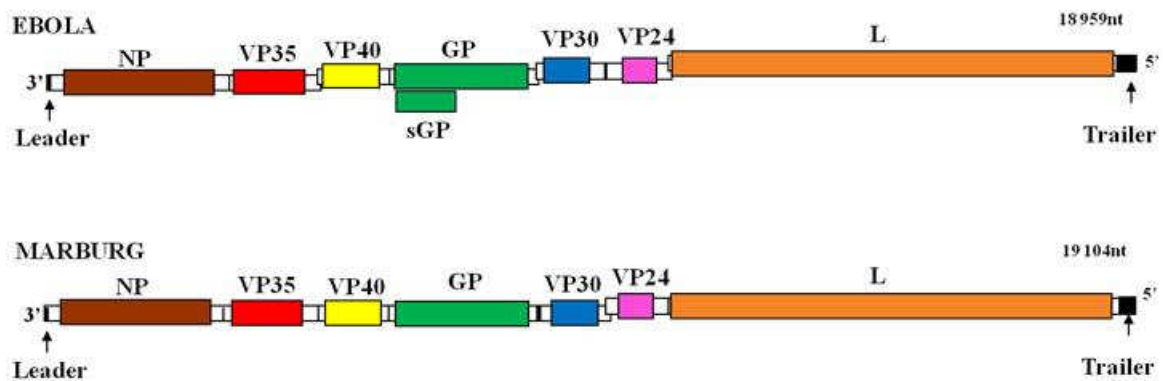


Figure 9: Structure du génome des Filovirus.

♦ *Contrôle de la transcription du génome*

L'ARN génomique des Filovirus est transcrit en 7 ou 8 ARN messagers, pour les virus Marburg ou Ebola, respectivement. La transcription est réalisée de façon linéaire et séquentielle, de 3' en 5'. A la fin de la lecture d'un gène, le complexe polymérasique s'arrête, puis repart. Ce complexe, formé par les protéines VP35, VP30 et la L polymérase, n'est pas solidement amarré à la matrice d'ARN génomique, ce qui induit qu'il peut se détacher entre deux gènes. Mais l'initiation de la transcription étant seulement possible au niveau de la séquence « leader », le complexe polymérasique va donc, s'il se détache, reprendre les étapes de transcription depuis le début et donc depuis le gène *NP* [132, 137]. Ainsi, les ARN messagers viraux seront produits de façon graduelle, avec une grande quantité d'ARNm pour la NP et une très faible quantité pour la L. Toutefois, une étude réalisée dans notre laboratoire indique que les quantités d'ARN messenger de la VP40 et de la VP24 du virus Ebola ne suivraient pas cette règle (Alazard-Dany et collaborateurs, données non publiées). (Voir **Figure 10**).

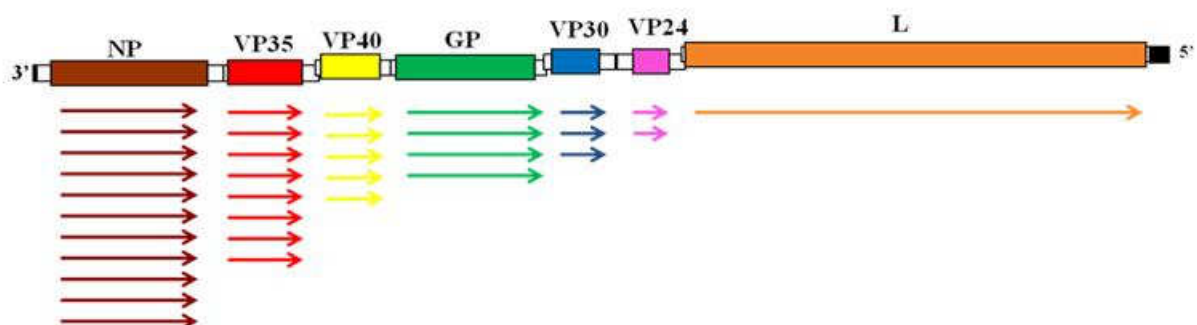


Figure 10: Illustration de la transcription graduelle du génome des Filovirus.

Les séquences d'initiation et de terminaison de la transcription pour chaque gène sont très conservées, et sont une caractéristique importante pour les Filovirus. Ainsi le signal d'initiation est CUNCNUNUAAUU et la séquence de terminaison UAAUUCUUUUUN. Les résidus UAAUU sont retrouvés aussi bien dans les séquences d'initiation que de terminaison, et parfois, les mêmes résidus

servent à la fois pour la terminaison d'un gène et l'initiation d'un autre, ce qui explique le chevauchement des cadres de lectures.

En 5' des ARN messagers exprimés, une région non codante, auto-complémentaire, est capable de former des épingles à cheveux [134, 138]. Cette structure est variable d'un gène viral à un autre et semble réguler l'expression des gènes viraux, soit en favorisant la fixation des ribosomes, soit en stabilisant les ARN messagers [129]. L'importance de ces structures secondaires a été établie lors d'expériences de mutagenèse de la séquence nucléotidique des ARNm de MARV en amont du site d'initiation de la traduction. Ces expériences ont montré que si elles étaient modifiées, des mutations compensatoires, permettant la restauration d'une structure secondaire de type épingle à cheveux, étaient observées [138].

Le signal de terminaison de la transcription est composé de 5 résidus Uridine pour le virus Marburg, et de 6 résidus Uridine, pour le virus Ebola. Ce site représente un signal pour la polyadénylation des ARNm par la machinerie cellulaire, qui permettra à ces ARNm viraux d'être pris en charge pour la traduction en protéines [130, 136, 138, 139].

Dans le cas du virus Ebola, le gène *GP* peut être édité et transcrit différemment, 20% des séquences résultant en l'expression de la GP transmembranaire (entière), et 80% des séquences étant non éditées et résultant en l'expression d'une protéine non structurale, à partir d'un fragment de gène, la sGP [140].

b. La Nucléoprotéine (NP)

Cette protéine est liée à l'ARN génomique viral, qu'elle protège en l'entourant d'une structure hélicoïdale formée de sous-unités de Nucléoprotéines. La NP est relativement variable, puisqu'elle présente 36% d'homologie entre le virus Ebola et le virus de Marburg. Elle est constituée de 739 Acides aminés (94kDa) et 695 Acides aminés (104 kDa) pour les virus Ebola et Marburg, respectivement. Cette protéine voit son poids moléculaire augmenté par les modifications post-traductionnelles qu'elle subit. Elle est phosphorylée, au niveau des résidus Sérine et Thréonine en carboxy terminal et cette phosphorylation semble indispensable puisque c'est seulement sous cette forme qu'elle est retrouvée dans la particule virale [141]. La NP du virus Ebola subit des étapes de glycosylation et d'ajout d'acides sialiques (sialylation) qui semblent indispensables à la formation de RNP, en favorisant l'interaction entre la NP et les protéines VP24 et VP35 [142].

D'un point de vue fonctionnel, la NP peut être divisée en une partie Amino-terminale, hydrophobe, qui est très conservée entre les virus Ebola et Marburg, puisqu'elle possède 55% d'homologie. En particulier, des alignements montrent que les résidus 296 à 329 du virus Ebola représentent 80% d'homologie avec les résidus 314 à 357 de la NP du virus de Marburg [143]. Le domaine amino-terminal est responsable de la liaison de la NP à l'ARN, qu'il soit viral ou cellulaire [127], mais également de l'auto-assemblage des sous unités de NP entre elles, résultant en la formation de structures proches des RNP, mais dont la taille est plus grosse [144]. La présence des protéines VP24 et VP35 résulte en une condensation de ces structures, qui seront alors morphologiquement identiques aux RNP observées au cours de l'infection virale [145].

La partie carboxy terminale de la NP est hydrophile, et est plus variable entre les différents Filovirus, puisque seulement 23% d'homologie de séquence ont été rapportés entre les virus Ebola et Marburg pour ces portions. Composée principalement d'acides aminés chargés négativement, il a été suggéré

que ce fragment soit important dans l'assemblage des particules virales car il pourrait former des interactions protéine-protéine [146]. Plus récemment, son rôle dans l'incorporation des RNP dans les virions a été confirmé [147], et une étude de notre laboratoire utilisant la technique du crible double hybride en levures identifie la partie carboxy-terminale de la NP comme site privilégié pour réaliser des interactions avec des protéines cellulaires (données personnelles non publiées). Les expériences futures permettront certainement d'identifier l'importance de ces interactions dans la réplication des Filovirus.

La NP du virus Ebola interagit avec la protéine VP40, ce qui permet le transport des RNP jusqu'à la membrane plasmique où aura lieu le bourgeonnement des virions [148]. De façon contradictoire une étude récente montre que la NP du virus de Marburg possède un domaine tardif, lui permettant de recruter la protéine TSG101 du complexe ESCRT I, facilitant ainsi le transport intracellulaire des RNP [149]. Les modalités du transport intracellulaire des RNP semblent donc différer entre les virus Ebola et Marburg.

Concernant le virus de Marburg, la NP est capable d'interagir directement avec les protéines VP30 et VP35, afin de recruter la polymérase L, formant ainsi un complexe tétramérique, pour réaliser les étapes de réplication et de transcription du génome [150, 151].

En conclusion, la NP est une protéine fondamentale pour la réplication des Filovirus, puisqu'elle intervient dans toutes les étapes du cycle réplcatif viral [145]. De plus, par son rôle d'encapsidation de l'ARN génomique viral, elle est la gardienne de l'intégrité du génome des Filovirus.

c. *La protéine VP30*

La protéine VP30 est codée par le 5^{ème} gène des Filovirus, et est constituée de 281 acides aminés pour le virus de Marburg, et de 288 chez le virus Ebola. Cette protéine est la 4^{ème} protéine de la RNP, et est donc unique dans l'ordre des *Mononegavirales*, où le complexe polymérasique est normalement constitué de 3 protéines (N, P et L). L'homologie de ces protéines entre Ebola et Marburg est de 28 à 29%.

Une colocalisation stricte de la VP30 avec la NP au niveau des corps d'inclusion a été observée, et des expériences de coimmunoprécipitation ont mis en évidence une interaction physique de la NP avec la VP30, révélant un rôle de la VP30 pour l'assemblage des RNP [150]. La VP30 est également capable d'interagir avec la polymérase L, et elle semble former un pont entre les sous unités de NP et la L dans la structure de la RNP [152].

Cette protéine est constituée d'un domaine amino terminal portant 6 résidus Sérine (Ser-29 à Ser-46) et 1 résidu Thréonine, pour le virus Ebola ou de 7 résidus Sérine et 1 résidu Thréonine pour le virus de Marburg. Ces résidus sont des cibles pour la phosphorylation par des enzymes cellulaires [151, 153] et la phosphorylation de la protéine VP30 du virus Ebola module son activité :

- non phosphorylée, elle agit comme co-facteur pour la transcription, et est incapable de lier la NP
- partiellement phosphorylée, notamment sur les résidus Ser-40 et Ser-42, elle est à la fois capable de favoriser la transcription des ARNm viraux, et de s'associer à la NP pour l'assemblage des RNP

- totalement phosphorylée, elle ne peut pas agir comme facteur de transcription, mais elle peut s'associer fortement avec la NP [151, 153, 154].

La protéine VP30 possède aussi dans sa partie amino-terminale une structure en doigt de Zinc [155, 156], qui permet de lier l'ARN, et qui est donc indispensable à la transcription virale. Pour EBOV, le contrôle transcriptionnel dépend de la capacité de la protéine VP30 à reconnaître les structures secondaires de l'ARN situées en amont des gènes [137]. Si ces structures sont déstabilisées, la transcription se fera indépendamment de la protéine VP30. De façon contradictoire, des études effectuées en Minigénome montrent que la protéine VP30 n'est pas nécessaire pour transcrire le génome du virus de Marburg [157], supposant une activité différente des deux protéines. Pourtant, le remplacement de la protéine VP30 du virus Ebola par la protéine VP30 du virus de Marburg dans un système de minigénome s'avère efficace [158], suggérant que la protéine VP30 du virus de Marburg peut assurer la fonction cruciale portée par la protéine VP30 du virus Ebola. Il semble donc que ces protéines jouent un rôle similaire, mais que quelques différences au niveau réplcatif existent entre le virus Ebola et Marburg, notamment en raison de la structure des régions 3' non codantes de leurs génomes [159]. Toutefois, dans les deux cas, la protéine VP30 est indispensable à la réalisation d'un cycle viral complet, comme l'ont montré les expériences de génétique inverse sur virus entier [160].

De plus, une caractéristique intéressante de la protéine VP30 est sa capacité à former des homo-oligomères, qui gouvernent son activité [161]. Par conséquent, une approche thérapeutique intéressante semble résider dans l'inhibition de l'oligomérisation par la synthèse de peptides qui miment les résidus impliqués dans ce processus [162].

d. La protéine VP35

Parmi les protéines constitutives des Filovirus, la protéine VP35 est certainement celle qui a été le plus largement étudiée jusqu'à présent. Au sein du génome, le gène de la VP35 est situé là où est situé le gène de la Phosphoprotéine (P) chez les autres *Mononegavirales*. Cette protéine, tout comme la protéine P, joue un rôle important dans la réplication et la transcription du génome viral, alors qu'aucune homologie de séquence n'a été retrouvée entre la protéine P et la protéine VP35 [157]. Cette protéine est constituée de 351 acides aminés pour le virus Ebola, et de 329 acides Aminés pour le virus de Marburg [163]. En transfection, la VP35 est répartie de manière homogène dans le cytoplasme cellulaire, tandis que sa co-expression avec la protéine NP induit une relocalisation dans les agrégats formés par cette dernière. De même, les analyses d'immunofluorescence révèlent que les protéines NP et VP35 sont localisées dans les corps d'inclusion viraux, où la VP35 semble être responsable de la condensation des RNP, pour obtenir une structure hélicoïdale régulière, signe de la maturation des RNP [127, 150]. Ce rôle dans l'assemblage des RNP a largement été étudié par ailleurs [142, 145, 164], et la capacité de la VP35 à interagir avec la protéine de matrice VP40 serait à l'origine de l'incorporation des RNP dans la matrice du virion [165], comme l'ont montré des expériences d'empaquetage d'un minigénome dans les VLP [166].

La protéine VP35 est en outre un cofacteur de la Polymérase virale, et à ce titre, interagit avec la partie amino terminale de cette protéine. Le complexe formé de la L et de la VP35 est considéré comme la forme active de la Polymérase. Les auteurs supposent que la VP35, en s'associant avec la NP, permettrait de recruter la L polymérase au niveau de l'ARN génomique, pour effectuer les étapes de réplication et de transcription du génome [150, 157]. Une étude récente met en lumière

l'importance des résidus basiques retrouvés dans la séquence de la VP35 du virus Ebola pour permettre à la fois l'interaction avec la NP (1^{er} cluster d'acides aminés basiques), l'interaction avec la L, et son rôle de cofacteur de la L polymérase [167, 168].

La VP35 possède un domaine coiled-coil formé par les résidus 82 à 118 pour Ebola [169] et par les résidus 70 à 120 pour le virus de Marburg [170]. Ces domaines sont importants pour que les protéines puissent former des homo-oligomères, une propriété qui semble essentielle à leur activité, et également, pour le virus Ebola, à son activité anti-IFN, précédemment décrite dans cette étude.

e. L'ARN polymérase ARN dépendante L (Large)

C'est la plus grande protéine des Filovirus, elle est constituée de 2212 (Ebola) ou 2330 (Marburg) acides aminés, les deux variantes présentant 46% d'homologie de séquence [157]. Cette protéine a une masse moléculaire avoisinant les 260 kDa, et en raison de la position du gène dans le génome des Filovirus, c'est la protéine la moins abondante [146]. L'analyse de sa séquence a révélé une forte proximité avec la Polymérase des Paramyxovirus [135, 136].

Elle possède une activité ARN polymérase ARN dépendante, qui n'existe pas dans les cellules-hôtes, et est par conséquent responsable de la synthèse des ARN génomiques et antigénomiques [136], ainsi que des ARN messagers viraux. Cette protéine établit des interactions avec les protéines VP30 et VP35, afin de permettre d'accéder aux ARN génomiques viraux encapsidés par les sous-unités de NP [150, 152, 157, 171]. Comme les autres polymérases virales, 3 domaines linéaires, dénotés A, B, et C, indispensables à la réalisation de son activité polymérasique, ont pu être définis [172]: le domaine A est nécessaire pour la liaison à l'ARN matrice (résidus 553 à 571 pour Ebola et 544 à 584 pour Marburg) ; le domaine B est important pour la reconnaissance de l'ARN, par la formation de ponts phosphodiester (résidus 738 à 744 pour Ebola et 709 à 749 pour Marburg) ; le domaine C est impliqué dans la liaison, soit à l'ATP, soit aux Ribonucléotides tri-phosphates qui seront incorporés dans la molécule d'ARN en cours de synthèse (résidus 1815 à 1841 pour Ebola et 904 à 943 pour Marburg).

En outre, la polymérase L des Filovirus est dotée d'activités Guanylyltransférase et Méthyltransférase (en Carboxy terminal), qui permettront la mise en place de la coiffe sur les ARN messagers viraux [139, 173].

ii. Les protéines de matrice.

Les protéines de matrice des Mononegavirales jouent un rôle fondamental dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales et sont donc associées aux phases tardives du cycle réplcatif viral [174]. Ce sont en général des protéines solubles dans le cytoplasme, capables d'interagir avec la membrane plasmique cellulaire, et également avec les Nucléocapsides viraux pour permettre leur transport vers le site de bourgeonnement du virus. Leurs activités évoluent donc au cours du cycle viral, et ces changements d'activité semblent dépendre des variations de conformation de ces protéines. Concernant les Filovirus, les premières descriptions de la structure des virions ont défini la protéine VP24 et la protéine VP40 comme protéines de matrice.

a. La protéine majeure de matrice : VP40

La protéine VP40 est la protéine la plus abondante des Filovirus [146]. Composée de 303 acides aminés pour le virus de Marburg et de 326 acides aminés pour le virus Ebola [163], cette protéine joue un rôle prépondérant dans les phases tardives du cycle viral, puisqu'elle est à l'origine de

l'assemblage et du bourgeonnement des virions. L'homologie entre la protéine VP40 du virus Ebola et celle du virus de Marburg est de 25%.

La protéine est composée de 2 domaines riches en feuillets bêta, reliés entre eux par une région « linker » composée de 6 acides aminés [175-177]. La partie amino terminale est impliquée dans la formation d'homo-oligomères. Des hexamères et des octamères ont été observés à la fois en transfection transitoire et dans l'infection par le virus Ebola [178, 179]. Les octamères sont obtenus par association de 4 dimères de VP40 en conformation antiparallèle, qui sont stabilisés par la présence de molécules d'ARN simple brin [180]. En particulier, les résidus Arg134 et Phe125 sont indispensables pour réaliser la liaison à l'ARN, et les expériences de mutagenèse ont montré qu'en l'absence de ces résidus, le bourgeonnement de particules virales infectieuses était affecté [179], ce qui démontre l'importance de cette conformation de la protéine VP40, et de son association à l'ARN viral pour réaliser un cycle infectieux complet [179]. Cette conformation pourrait être à l'origine de l'interaction avec la RNP, ou encore de l'inhibition dépendante de la VP40 des étapes de réplication et de transcription du génome viral [181, 182].

La partie carboxy terminale (résidus 213 à 326) de la protéine VP40 est hydrophobe et contient des résidus chargés positivement, elle est impliquée dans l'interaction avec les membranes lipidiques [14, 175-177]. En particulier, *in vitro*, il a été montré que la protéine VP40 interagit préférentiellement avec les lipides dont le taux de phospholipides chargés négativement est élevé [175]. Il semble en outre que ce domaine soit impliqué dans le maintien de la structure monomérique de la protéine VP40, et que, lorsque ce domaine est déstabilisé (notamment par l'interaction avec les membranes lipidiques), la formation d'oligomères soit induite grâce à la moitié amino-terminale disponible. Ces oligomères, situés sous la membrane plasmique, formeraient une sorte de matrice, ou échafaudage, qui faciliterait l'assemblage du nouveau virion et provoquerait l'évagination de la membrane plasmique lors du bourgeonnement [183].

Ce sont au final environ 80% des VP40 synthétisées qui s'associent rapidement aux membranes intracellulaires [122, 144, 150, 184] lors de l'infection de cellules par le virus Ebola. En effet, ces protéines sont tout d'abord retrouvées dans de petites vésicules intracellulaires, dans les endosomes tardifs, puis s'accumulent dans des corps multivésiculaires (MVB : Multivesicular Bodies), avant d'être dirigées aux membranes plasmiques [184, 185], et plus particulièrement au niveau des radeaux lipidiques [186]. Le transport de la protéine VP40 à la membrane plasmique semble donc intervenir de façon passive, mais il a également été montré qu'elle empruntait le système COPII, en se liant à la protéine Sec24c [187]. Enfin, il a été montré que la portion carboxy terminale de la protéine VP40 du virus Ebola interagissait avec la tubuline cellulaire, et favorisait la polymérisation des microtubules [188], probablement pour favoriser le transport des RNP à la membrane plasmique. En parallèle, la formation de Filopodes, des évaginations membranaires formées par la polymérisation de l'actine, a été mise en avant dans le processus de bourgeonnement du virus de Marburg, laissant supposer un rôle régulateur de la protéine VP40 dans ce processus [189].

La protéine VP40 est également capable d'interagir avec les protéines NP et VP35 de la RNP, probablement dans le but d'incorporer les RNP dans les nouveaux virions [166, 190]. De plus, la présence de cette protéine dans les corps d'inclusions où s'accumulent les RNP en cours de maturation a été rapportée, suggérant un rôle dans le transport des RNP vers le site d'assemblage et de bourgeonnement des virions [122, 130, 163, 191].

La protéine VP40 est à l'origine du bourgeonnement des virion, puisque transfectée seule, elle induit la formation de pseudo particules virales [192]. L'addition de la GP favorise cette production de pseudoparticules [186, 193], mettant en avant la complémentarité de ces deux protéines dans le processus de bourgeonnement.

Enfin, un domaine tardif, constitué des acides aminés PPXY a été identifié dans la partie amino-terminale des protéines VP40 des virus Ebola et Marburg [185, 194]. Ce domaine joue un rôle majeur dans le bourgeonnement, de la même façon que les domaines tardifs des protéines M des rhabdovirus [195-197] et Gag des rétrovirus [198]. Pour la protéine VP40 du virus Ebola, ce domaine chevauche un autre domaine tardif : PTAP, pour former la séquence PTAPPEY. Cette séquence permet de lier les facteurs cellulaires Nedd4 et Tsg101 [199-201], afin de réguler le bourgeonnement. Toutefois cette observation a été controversée. En effet, des virus mutants pour ce domaine tardif sont toujours capables de se répliquer [202], laissant supposer l'existence, soit dans la protéine VP40, soit dans d'autres protéines virales, d'autres domaines tardifs également capables de permettre le bourgeonnement, comme il a été récemment montré pour la NP du virus de Marburg [149].

Cette protéine a également été retrouvée sous forme soluble dans le surnageant de cellules infectées et dans le sérum d'animaux infectés par le virus Ebola adapté au cobaye [203]. Le rôle de ce facteur soluble n'est pas encore déterminé. Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine VP40 du virus de Marburg est impliquée dans l'adaptation du virus au modèle rongeur, et est responsable de l'inhibition de la voie IFN de type 1, des propriétés portées par la protéine VP24 dans le cas du virus Ebola.

b. La protéine VP24 : une protéine unique

Pour la VP24, il n'existe aucun équivalent chez les autres *Mononegavirales*, et il est donc difficile de comprendre le rôle que cette protéine joue au cours du cycle réplcatif viral. Toutefois, ses capacités d'oligomérisation [204, 205], d'association aux membranes lipidiques [204, 205], ses caractéristiques d'hydrophobicité, et sa position dans le virion [146, 206] confirment qu'elle possède les caractéristiques d'une protéine de matrice.

Les protéines VP24 des virus Ebola et Marburg possèdent 36% d'homologie, et sont respectivement constituées de 253 et 251 acides aminés.

Alors que la protéine VP24 du virus de Marburg, dont le rôle est indispensable à la réplication du virus [205] a été peu étudiée, de nombreux travaux ont cherché à déterminer le fonctionnement de la VP24 du virus Ebola au cours du cycle viral. L'utilisation de minigénomes a mis en évidence son rôle inhibiteur des étapes précoces du cycle réplcatif [164, 182]. Par contre, des études ont clairement identifié la capacité de la VP24 à interagir avec les protéines VP35 et NP, résultant en la formation de structures morphologiquement indifférenciables des RNP observées au cours de la réplication virale [142, 190]. L'identification des résidus de la VP24 impliqués a montré que les extrémités amino et carboxy-terminales de la VP24 étaient indispensables pour former de telles structures [164]. La mise au point des VLP infectieuses a permis d'identifier que la VP24 était indispensable pour la formation de RNP fonctionnelles et qu'en absence de VP24, ces iVLP perdaient leur caractère infectieux [207]. Par contre, des essais de bourgeonnement de pseudo-particules virales ont montré que la protéine VP24 n'était pas indispensable pour cette étape [200, 208].

Enfin, une étude récente réalisée dans notre laboratoire a mis en évidence que la suppression de l'expression de la VP24 par un système d'ARN interférent diminuait drastiquement la quantité de virions produits. L'analyse des cellules infectées en microscopie électronique révèle qu'en l'absence de VP24 les RNP semblent moins condensées, et forment finalement des structures tubulaires similaires à celles observées lors de la transfection de la NP [209]. Cette étude semble confirmer l'hypothèse qui avait été émise auparavant selon laquelle la protéine VP24 assurerait la transition entre les étapes de réplication/transcription du génome et les étapes plus tardives de transport et bourgeonnement du nouveau virion.

Enfin, comme il a été vu précédemment, la protéine VP24 du virus Ebola est un inhibiteur de la voie de réponse à l'IFN, et semble être la clé du développement de la pathogénicité chez le rongeur, et donc de l'adaptation du virus Ebola à un nouvel hôte. Ces données en font un facteur de virulence majeur, et par conséquent, une cible thérapeutique intéressante.

iii. La protéine de Surface (GP)

Les GP sont associées en surface des cellules sous forme de trimères [210]. Ces trimères sont la clé pour ouvrir la porte d'entrée du virus dans la cellule. Ils sont capables de se fixer aux récepteurs cellulaires du virus : DC-SIGN, DC-SIGNR, TIM1, et déterminent ainsi le tropisme cellulaire du virus. Les mécanismes d'entrée du virus seront étudiés plus en détail dans le paragraphe concernant le cycle viral.

La GP est codée par le quatrième gène du génome, et de façon différente pour le virus Marburg et Ebola. Alors que le gène de la GP du virus Marburg ne possède qu'un seul cadre de lecture, et code pour une seule protéine de 681 acides Aminés, le gène de la GP du virus Ebola contient 2 cadres de lecture. 80% des ARN messagers synthétisés codent pour une petite Glycoprotéine, sécrétée, soluble : la sGP (voir paragraphe suivant). Les 20% restants résulteront d'un phénomène d'édition au cours de la transcription du génome viral, au cours duquel une Adénosine (A) sera ajoutée par la Polymérase L à un cluster contenant déjà 7 A. L'ARNm transcrit contiendra donc la totalité des 2 cadres de lecture, et permettra de produire une GP entière de 676 acides aminés, dont la structure sera proche de celle de la GP de Marburg, les 2 protéines ayant 27% d'homologie de séquence. Les GP « entières » seront exprimées à la surface de la cellule [140, 211, 212].

La protéine GP est synthétisée sous forme d'un précurseur, la pré-GP [140, 213], puis sera dirigée dans le Réticulum Endoplasmique (ER), où elle sera N-Glycosylée, et où le peptide signal sera clivé [214, 215]. Elle sera ensuite dirigée dans l'appareil de Golgi, où auront lieu les O-Glycosylations, avant de migrer dans le réseau transgolgien où auront lieu des modifications supplémentaires, notamment le clivage par la Furine [212, 216]. Ce clivage résultera en 2 sous-unités, GP1 et GP2, distinctes, qui resteront liées ensemble par des ponts disulfures entre les résidus Cystéines 53 et 609 pour Ebola, et 37 et 610 pour Marburg [78, 217]. Pour le virus Ebola, la sous-unité GP1 est strictement extracellulaire et constituée de 501 Acides Aminés, tandis que la GP2 forme le domaine transmembranaire et est constituée de 175 Acides Aminés. Ces sous unités vont s'assembler sous forme de trimères, et seront principalement localisées au niveau des radeaux lipidiques [186, 218]. Des études employant des vecteurs rétroviraux ont montré que la GP1 était responsable de l'association récepteur-virus [67, 219]. La digestion de la GP1 est cruciale lors du phénomène de fusion membranaire médiée par les cathepsine B et L, des protéases qui ciblent les cystéines, actives dans les endosomes [220, 221]. Elles permettent de libérer le peptide de fusion pour permettre la

fusion de la membrane du virus avec celle de la vésicule d'endocytose, libérant ainsi la RNP dans le cytoplasme de la cellule [220].

La similitude observée entre les GP des Filovirus et la protéine GP41 du virus HIV d'une part, et la protéine HA2 du virus Influenza d'autre part, a permis de classer les GP des Filovirus dans la superfamille des Glycoprotéines virales de fusion de type I [77, 130, 213, 215]. Les protéines de cette superfamille possèdent, dans leur état inactif, au niveau du domaine transmembranaire, un peptide de fusion hydrophobe, replié au coeur de la structure. Ce peptide est formé, pour la GP du virus Ebola, par les résidus 524 à 539 [77] de la sous unité GP2. La région centrale de la GP est globalement hydrophile, sa séquence est très variable entre les différents sous-types viraux, et elle possède des sites pour la O- et la N-Glycosylation [215, 216, 222]. A l'extrémité carboxy-terminale, les résidus 651 à 672 sont responsables de l'ancrage de la GP2 à la membrane plasmique, et des résidus de 4 acides aminés pour le virus Ebola, et de 8 acides aminés pour le virus Marburg formeront la queue cytoplasmique [216].

La GP1 du virus Ebola possède un domaine Mucine, extracellulaire, fortement glycosylé. En transfection transitoire, l'expression de la GP1,2 semble conduire à l'arrondissement et au détachement des cellules, un effet cytopathique de la GP a donc été rapporté [223-225]. De plus, les expériences identifiaient une diminution de l'expression de certains marqueurs de surface en présence de GP, mais une étude récente de notre laboratoire montre qu'il ne s'agirait pas d'une diminution de l'expression de ces protéines de surface, mais plutôt, du fait de l'empiètement stérique des trimères de GP glycosylées, d'un masquage des épitopes de surface, comme par exemple les molécules du CMH de classe I [226, 227]. Les auteurs suggèrent que cette forte glycosylation contribuerait également à l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, en empêchant la reconnaissance par des anticorps anti-GP.

De plus, la forme transmembranaire des trimères de GP est clivée par la matelloyprotéase TACE (TNF α Converting Enzyme), une enzyme impliquée dans la maturation du TNF α [228]. Ce clivage résulte en la libération dans le milieu extracellulaire du peptide GP_{1,2, Δ} (voir paragraphe sur les protéines solubles).

La GP de Marburg et la GP d'Ebola possèdent toutes les deux une séquence hydrophobe qui est homologue au domaine immunosuppresseur de la protéine p15E de rétrovirus oncogènes [222, 229]. Il a été suggéré que ce domaine aurait un rôle dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire observée dans la pathogenèse [230] mais à l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de conclure quant au rôle de ce domaine dans la pathogenèse virale.

Récemment, une interaction entre la protéine GP du virus Ebola et la Téthérine a été relatée [231, 232]. Cette interaction permet au virus d'échapper au contrôle de son hôte en empêchant le blocage des particules virales au niveau de la membrane plasmique cellulaire.

2. Les protéines solubles

L'existence des protéines solubles et leur apparition au cours de l'infection virale est connue seulement pour le virus Ebola, mais pas pour MARV. Il semble que cette caractéristique soit une des différences principales entre EBOV et MARV.

i. La GP soluble, sGP.

C'est une petite protéine dont le poids moléculaire avoisine les 60 kDa. Elle est constituée de 364 Acides Aminés, dont les 295 premiers sont totalement identiques à ceux de la GP1, alors que les 69 derniers sont uniques. Le domaine C terminal est riche en Cystéine. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur, pré-sGP, qui subira les mêmes étapes de maturation que la GP (clivage du peptide signal, N-Glycosylation, Oligomérisation dans le ER, O-Glycosylation et clivage post traductionnel dans le Golgi) [233, 234]. Le clivage post-traductionnel par la Furine résulte en la libération d'un petit peptide 10kDa, le peptide Delta [234]. Au cours de sa maturation, la sGP se conforme en dimères anti-parallèles dont les sous unités sont reliées par des ponts disulfures entre les résidus Cys53 et Cys306 [217, 233]. Le rôle de cette protéine n'est pas clairement établi, mais il semblerait qu'elle soit importante dans le développement de la pathogenèse chez l'homme et les primates, puisqu'elle a été retrouvée en grande quantité dans le sang de patients infectés [211]. Il a été suggéré qu'elle protégerait les cellules contre l'effet du TNF α , ce qui permettrait aux cellules infectées de survivre [235]. Un rôle de leurre d'échappement au système immunitaire a également été proposé [236]. Mais il semblerait que la sGP soit principalement synthétisée pour réguler le taux de GP « entière » produite au cours de l'infection. En effet, l'emploi d'un mutant viral incapable de réaliser l'édition au niveau transcriptionnel (NOED pour *No-Editing*) démontre une plus grande toxicité cellulaire, notamment en raison d'une saturation de l'appareil de Golgi et du Réticulum Endoplasmique, qui résulte en une plus faible réplication virale [75, 78]. La sGP favoriserait donc la réplication virale en évitant de produire trop de GP « entière ». L'absence d'un tel mécanisme pour le virus Marburg laisse supposer l'existence d'un autre mécanisme qui régulerait l'expression de la GP, mécanisme n'ayant pas été identifié à l'heure actuelle.

ii. La GP_{1,2,Δ}

Cette forme soluble est libérée dans le milieu extracellulaire suite au clivage de la GP membranaire par la protéine TACE. Ce clivage protéolytique intervient entre les résidus Aspartate 637 et Glutamate 638 [228]. Elle est donc constituée de la sous unité GP1 entière, et d'une portion de la protéine GP2. La conformation trimérique est conservée, mais semble plus facilement dissociable. Cette forme soluble a été retrouvée en quantité significative dans le sérum de cobayes infectés avec le virus Ebola adapté, et les auteurs suggèrent qu'elle agirait comme leurre du système immunitaire, puisqu'elle peut lier les anticorps neutralisants dirigés contre la GP exprimée à la surface de la cellule.

iii. La VP40

Une étude récente montre que les différentes formes de la GP ne seraient pas les seules protéines pouvant être retrouvées dans le milieu extracellulaire lors de l'infection par le virus Ebola. En effet, autant en expression transitoire que lors d'infection de lignée cellulaire, une quantité significative de la protéine VP40 est retrouvée sous forme soluble, sécrétée [203]. Cette protéine a également été retrouvée dans le sérum de cobayes infectés par la forme adaptée du virus. L'étude suppose que la VP40 sécrétée serait sous forme monomérique, et que la sécrétion emprunterait une voie sécrétoire non conventionnelle, comme l'ont mis en avant les expériences inhibant le transport dépendant du Golgi et du réticulum endoplasmique.

3. Cycle réplcatif

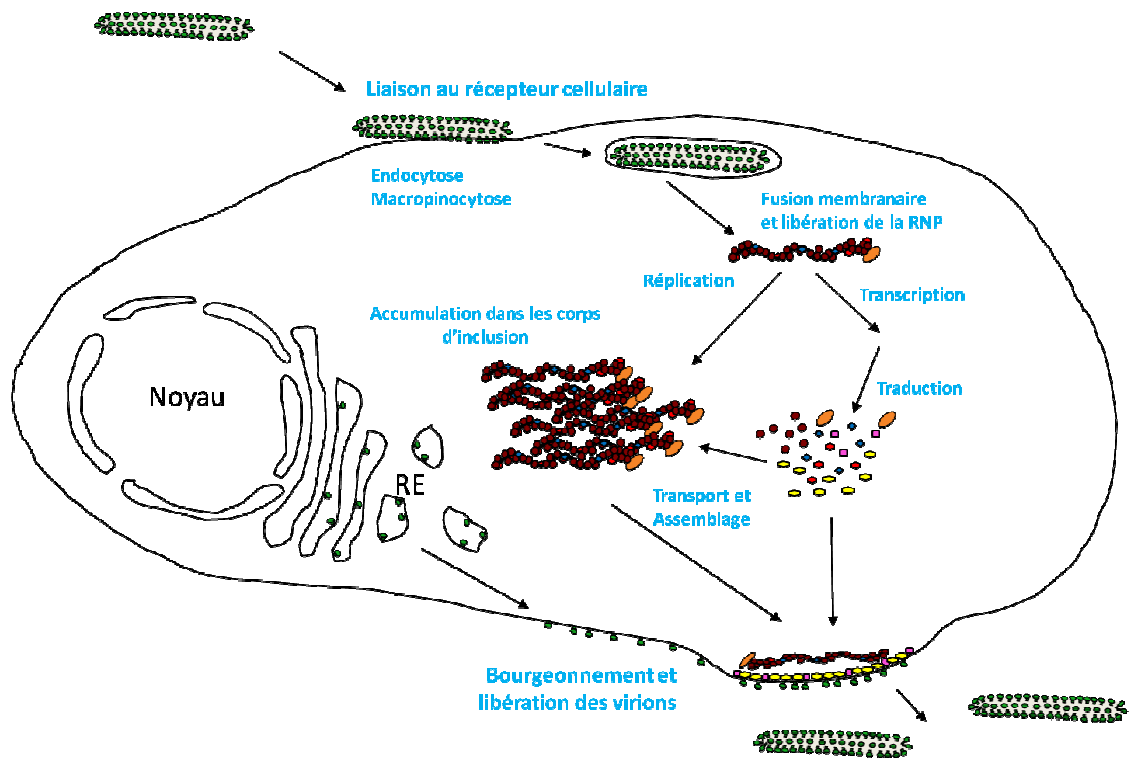
i. Les phases précoces : de l'attachement du virus à la synthèse de nouvelles sous unités virales :

Le cycle de réplcation des Filovirus est présenté **Figure 11**. Le virion, présent dans l'environnement cellulaire, va s'attacher, via la GP de surface, à ses cellules cibles en faisant intervenir des protéines membranaires cellulaires appartenant à la classe des Lectines, dont la protéine DC-SIGN et la protéine DC-SIGNR [237]. Mais ces molécules ne sont pas présentes à la surface de toutes les cellules infectées par les Filovirus, ce qui suggère l'existence d'autres récepteurs. De plus, des études ont montré que l'attachement aux lectines ne permettaient pas un cycle réplcatif complet, suggérant la nécessité d'un attachement à une autre protéine cellulaire [238]. Une étude récente a montré que la protéine cellulaire TIM-1 était un récepteur des virus Ebola et Marburg [71]. Cette protéine cellulaire est présente à la surface des Lymphocytes Th2, des cellules de l'épithélium rénal, ainsi que d'autres cellules épithéliales, telles que celles de la trachée, et de l'œil. Cette découverte laisse supposer une contamination possible par les aérosols, bien qu'à l'heure actuelle, elle n'ait pas été rapportée. Par ailleurs, les cibles primaires de l'infection, Macrophages et DCs, ne portent pas cette molécule à leur surface, ce qui laisse supposer l'existence d'un autre récepteur des Filovirus.

Une fois la particule virale attachée à la surface membranaire, elle va être internalisée dans une vésicule par endocytose médiée par la clathrine ou les cavéolines [239, 240]. Des études récentes, employant des VLP du virus Ebola ont aussi mis en évidence que le processus de Macropinocytose était un médiateur de l'entrée cellulaire [241-245]. La membrane du virus va alors fusionner avec la membrane de la vésicule d'entrée (endosome ou macropinosome), libérant son contenu dans le cytoplasme cellulaire. Cette fusion fait intervenir des facteurs cellulaires, dont les cathépsines B et L, et la protéine Niemann-Pick C1 [246, 247].

L'ARN viral génomique sera alors transcrit en ARN messagers viraux qui seront pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire, et permettront la synthèse de nouvelles protéines virales. En parallèle l'ARN génomique servira de matrice pour la synthèse d'anti-génomes (de polarité positive) qui seront eux-mêmes des matrices pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques, auxquelles viendront se lier les NP. L'interaction entre la NP et l'ARN viral permettra d'initier l'assemblage des RNP, en recrutant les protéines VP30, VP35 et la polymérase L. Pendant cette étape, la GP de surface va être synthétisée, et sa maturation se fera notamment dans l'appareil de Golgi où elle sera clivée par des Furines, pour permettre la formation de deux sous unités : GP1 et GP2, qui resteront liées par un pont disulfure. Alors que la GP1 représentera la forme extracellulaire, la GP2 constituera la forme transmembranaire.

A



B

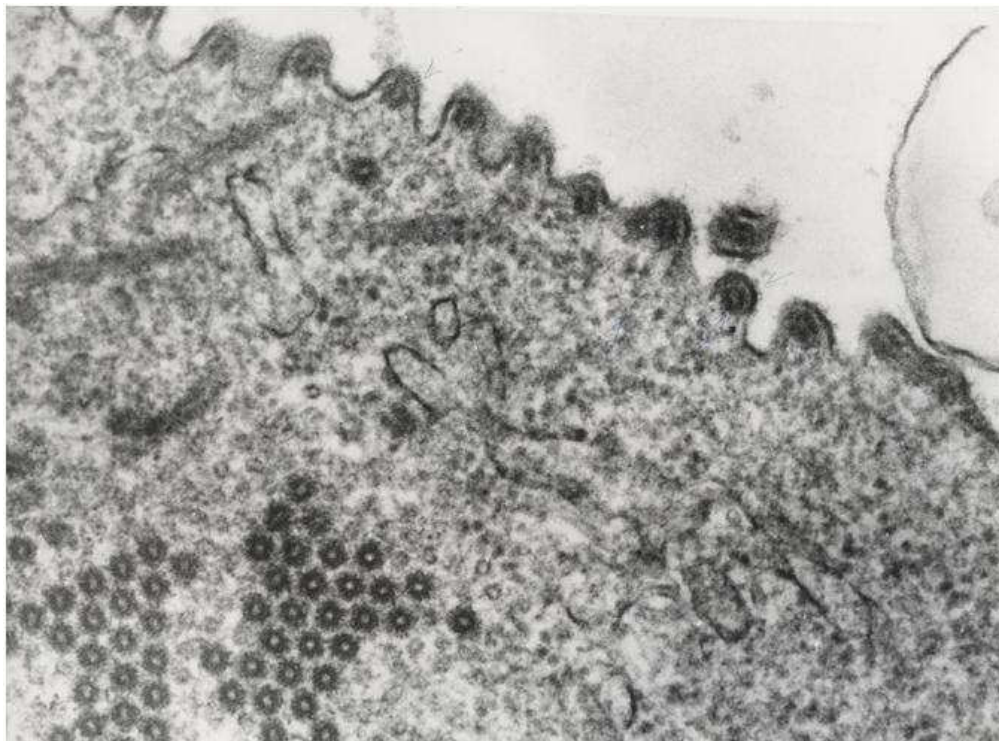


Figure 11: Cycle réplcatif des Filovirus. (A) Représentation schématique des différentes étapes du cycle réplcatif viral, depuis l'infection de la cellule jusqu'à la libération de virions dans le milieu extracellulaire. (B) Observation d'une cellule infectée au microscope à transmission, mettant en évidence l'accumulation des RNP dans le cytoplasme cellulaire, et la libération de particules virales au niveau de la membrane plasmique (photo : Pr V. Volchkov).

ii. Les phases tardives : transport, assemblage et bourgeonnement :

Les RNP nouvellement synthétisées sont stockées dans des corps d'inclusion cellulaire, où elles vont subir des étapes de maturation et de condensation qui sont indispensables pour permettre un assemblage correct du nouveau virion. La protéine VP24 semble avoir une action majeure au cours de cette maturation, comme l'ont montré les expériences employant de petits ARN interférents dirigés contre la VP24 au cours de l'infection [205, 209]. Une fois matures, les RNP seront adressées à la membrane cellulaire.

3 modes de transport à la membrane cellulaire ont été identifiés pour les composants de la particule virale (**Figure 12**):

- La force principale pour induire l'assemblage sous membranaire des particules virales est sans conteste la protéine VP40. Cette protéine initialement soluble dans le cytoplasme s'associe rapidement avec les membranes cellulaires. Elle s'accumule alors dans les corps multivésiculaires (MVB pour *Multi Vesicular Bodies*) périnucléaires [184], puis emprunte les endosomes cellulaires, pour réaliser une migration rétrograde dans ce système, et être finalement transportée à la périphérie cellulaire, sous les radeaux lipidiques (**Figure 12 A**).
- La voie sécrétoire, qui utilise le Réticulum endoplasmique [248] et l'appareil de Golgi, est à l'origine du transport à la surface cellulaire de la GP, glycosylée au cours de ces différentes étapes et qui, après passage dans le réseau Transgolgien, sera ancrée dans la membrane cellulaire [216] (**Figure 12 B**). La GP peut aussi, grâce à sa capacité à interagir avec la protéine VP40 par 2 résidus acétylés situés dans la portion cytoplasmique de cette protéine, emprunter la voie des MVB pour être adressée au niveau membranaire [184] (**Figure 12 C**).
- La protéine VP40 est également essentielle pour l'adressage des RNP depuis les corps d'inclusion à la surface cellulaire [190]. De petites quantités de VP40 ont d'ailleurs été retrouvées au niveau des corps d'inclusion. La VP40 interagit avec la NP [148], ce qui semble favoriser le transport intracellulaire de ces protéines, comme il est montré par l'augmentation de sécrétion de VLP en présence de NP [200] (**Figure 12C**). Toutefois, les RNP liées à la protéine VP40 ne colocalisent pas avec les MVB. Le transport intracellulaire de ces structures, bien que dépendant de la protéine VP40, serait indépendant de la voie rétrograde des endosomes empruntée par la VP40 seule, et probablement que différentes conformations de la VP40 seraient responsables des différentes phases de transport (soluble, multimérique, associée aux membranes). Il semble que les interactions de la protéine VP40 avec les protéines du cytoplasme cellulaire soient cruciales pour l'adressage des RNP à la membrane plasmique, en particulier le rôle du cytosquelette semble être fondamental [188].

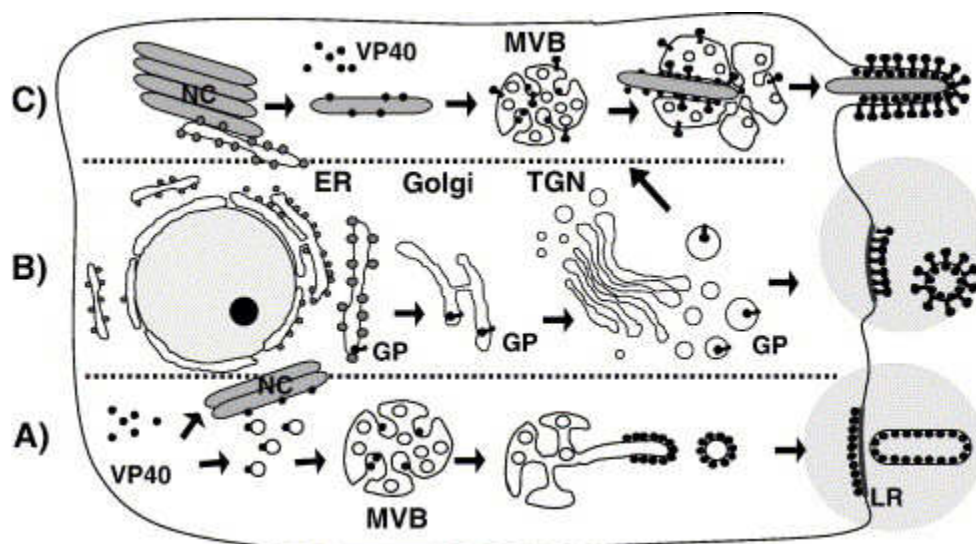


Figure 12: Mode de transport intracellulaire des différents composants du virion vers le site d'assemblage, d'après [125].

Une fois toutes ces étapes remplies, les composants du nouveau virion se retrouvent sous la membrane plasmique pour l'assemblage final du virion. Le bourgeonnement s'effectuera ensuite à partir de ce site, et une étude a montré que l'enrichissement membranaire en cholestérol et en glycosphingolipides (portions de membranes appelées Rafts) favorisait le bourgeonnement des Filovirus [186]. De façon intéressante, les protéines VP40 et GP sont préférentiellement adressées à ces micro-domaines, dans le but de favoriser le bourgeonnement. Le ciblage spécifique de ces micro-domaines laisse supposer que certains de leurs constituants, protéiques ou glucidiques, seront embarqués à la surface du nouveau virion, et joueront potentiellement un rôle important dans l'attachement du virion à sa nouvelle cellule cible. Les virions seront finalement libérés dans le milieu extracellulaire pour infecter de nouvelles cellules.

F. Modèles d'étude

1. Les modèles animaux

Le caractère sporadique des épidémies à Filovirus, lié aux contraintes géographiques de la zone d'endémicité de ces virus (peu d'infrastructures et de laboratoire de recherche capables de prendre en charge des échantillons de pathogènes de type IV) rend difficile le développement des connaissances sur les Filovirus et leur pathogénicité pour l'homme. Les experts en virologie ont donc rapidement employé le modèle animal pour comprendre les dérèglements qui conduisent à une très haute pathogénicité de ces virus, mais aussi pour mettre au point des stratégies thérapeutiques et protectives contre ces virus.

i. Les primates non humains

Les primates sont sans conteste le meilleur modèle pour comprendre et mettre au point des stratégies thérapeutiques et vaccinales contre les Filovirus. En effet, ces animaux sont naturellement infectables par ces virus, et leur sensibilité à l'espèce Reston du virus Ebola laisse même supposer qu'ils seraient plus sujets au développement d'une maladie suite à l'infection par un Filovirus que l'homme [249]. Cette observation semble confirmée par les études d'infection de primates en

laboratoire, qui ont montré que la mort intervient pour ces animaux entre le jour 6 et le jour 9 après l'infection [250-252] par EBOV, et entre le jour 7 et le jour 12 après l'infection par MARV [253] soit beaucoup plus rapidement que chez l'homme. En effet, chez ce dernier la fatalité arrive entre le jour 6 et le jour 10 après le début des symptômes, eux même apparaissant après une période d'incubation pouvant aller jusqu'à 21 jours. Il serait intéressant de comprendre quelles sont les failles du système immunitaire simien que les Filovirus exploitent et qui sont responsables de cette différence dans la vitesse de développement de la FHV. Notamment, il a été rapporté que dans les cas d'infection expérimentale de singes, il n'apparaît pas de réponse anticorps spécifique [254], contrairement à l'homme, chez qui la mise en place d'une réponse adaptative est un déterminant majeur quant à l'issue de la maladie [60]. Toutefois ces observations doivent être modérées par le fait que la dose infectieuse employée expérimentalement est généralement plus importante que celle qui a causé une infection « naturelle ». Par conséquent, il se peut que l'absence de mise en place de réponse adaptative chez le singe soit un artéfact du modèle expérimental.

Par ailleurs, il a été observé que les singes pouvaient succomber à l'infection suite à une inoculation par voie orale, aérosol et conjonctive [255, 256], ce qui ne semble pas être le cas pour l'homme, comme ont pu en attester les données recueillies lors des bouffées épidémiques. Cette différence est un autre reflet de la plus forte sensibilité des singes à l'infection aux Filovirus par rapport à l'homme. La mise au point de traitement et de vaccins efficaces chez les singes, plus sensibles à l'infection, est donc très prometteuse et laisse espérer une très bonne efficacité chez l'homme.

Enfin, les singes développent également un syndrome de FH dont les signes cliniques sont très proches de ceux rapportés chez l'homme [250, 252] (voir **Tableau 2**), ce qui renforce le choix de ce modèle pour l'étude de traitement antiviraux. Toutefois, bien qu'une thrombocytopénie soit clairement rapportée chez le singe, les mécanismes à l'origine de ces troubles hémorragiques ne sont pas clairement établis, et il serait intéressant d'analyser la CIVD, le fonctionnement plaquettaire et les dysfonctionnements de l'endothélium vasculaire chez ces animaux.

ii. Les virus adaptés aux rongeurs

L'utilisation de singes pour la compréhension de la pathogénicité et la mise au point de stratégies antivirales contre les Filovirus se heurte aux réglementations éthiques et à des problèmes logistiques majeurs, en particulier pour le travail en milieu confiné. Il était donc nécessaire, autant d'un point de vue éthique que d'un point de vue pratique de mettre au point des modèles animaux plus adaptés au travail en laboratoire P4 et plus faciles à obtenir et à manipuler. C'est ainsi que des chercheurs ont mis au point des modèles de Filovirus adaptés aux rongeurs, en réalisant des passages en série de virus chez ces animaux. Brièvement, il s'agit d'inoculer le virus sauvage à des animaux (cobaye ou souris), et de récupérer leur sérum (ou un broyat d'organe) quelques jours après l'infection pour l'inoculer à de nouveaux animaux, naïfs. Après quelques passages, le virus échappe à la pression de sélection exercée par l'hôte, mute pour se répliquer plus, et par conséquent, devient pathogène pour l'espèce considérée. Ces virus adaptés existent pour l'espèce Zaïre du virus Ebola, et pour MARV. Par contre, elle fait encore défaut pour les espèces Soudan, Taï forest, Reston et Bundibugyo du virus Ebola.

Bien que le syndrome développé chez les rongeurs par le virus adapté soit quelque peu différent de ce qui est observé chez les primates par le virus naturel, ces animaux restent un outil important pour réaliser un criblage de molécules thérapeutiques et vaccinales.

a. La souris

Alors que le virus Ebola sauvage n'est pas pathogène de la souris adulte, les souriceaux nouveau-nés, chez qui ce virus est administré par voie péritonéale, semblent succomber à l'infection [257]. Cette sensibilité dépendante de l'âge pourrait s'expliquer par le fait que chez le souriceau nouveau-né, le système IFN de type I, crucial pour la résistance murine aux Filovirus [82], est moins fonctionnel que chez l'adulte, notamment du fait que le taux d'une des molécules effectrices de ce système, la 2'-5' OligoAdénylate Synthetase (2'-5' OAS), s'accroît quand la souris vieillit [258].

De plus, les souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), dont la caractéristique principale est l'incapacité à mettre en place une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T et B, sont sensibles à l'infection par les Filovirus [82, 259]. Chez ces souris, l'infection par les virus Ebola et Marburg cause un ralentissement progressif de l'activité, une anorexie quelques semaines après l'infection, puis ces souris meurent 20 à 25 jours après l'infection par le virus Ebola.

Enfin, les souris dont le système IFN I est altéré, par exemple les souris IFNAR KO ou les souris STAT1 KO, sont hautement sensibles aux infections à Filovirus, qui les tuent dans la semaine suivant l'injection sous-cutanée du virus [82], soit encore plus brusquement que dans les situations « naturelles » d'infection.

Les études ont permis, en passant successivement le virus Ebola 9 fois dans des souris, de développer un mutant viral qui échappait au contrôle par le système immunitaire murin, et induisait donc le développement d'une maladie chez la souris. La période d'incubation de ce virus chez la souris est de 3 jours, et la mort intervient 5 à 7 jours plus tard [260]. Les titres viraux sont élevés et peuvent atteindre 10^9 pfu/gramme d'organe (*plaque-forming unit*), et les taux sériques de transaminases (ALAT, ASAT) sont augmentés, alors que se produisent de fortes altérations du foie et de la rate. Ce système ne fonctionne que lors de l'injection intra-péritonéale du virus, et il est intéressant de noter que, si ce virus est administré par une autre voie (*ie*, sous cutanée, intra-musculaire), l'infection n'est pas létale, ce qui reflète là encore l'importance de la prise en charge du virus par le système immunitaire. En outre, la forte quantité de cellules phagocytaires dans la cavité péritonéale fait de cette zone une niche importante pour la réplication virale.

Pour MARV, l'obtention d'un variant pathogène chez la souris a été plus complexe. Il a s'agit d'inoculer le virus sauvage à des souris SCID, chez qui la mort intervient 50 à 70 jours après l'inoculation. Dix passages en série réalisés sur ces souris à partir de broyat de foie de souris infectées ont permis de réduire cette durée d'incubation, les souris mourant alors entre 7 et 10 jours après l'inoculation. Les souris SCID infectées avec le virus « adapté » sont d'abord sujettes à une anorexie et une perte de poids, puis des troubles neurologiques apparaissent (arrêt du toilettage, paralysie) et pour certaines, des signes hémorragiques ont été rapportés. La virémie est assez élevée, atteignant au 6^{ème} jour après l'infection des taux de 10^6 pfu/ml, et le virus est retrouvé dans le foie, la rate, le sang. Une chute du taux de plaquettes, et une augmentation du taux sérique des enzymes du foie sont rapportées [259]. Il a ensuite été nécessaire d'effectuer 14 autres passages en série sur des souris adultes immunocompétente de type Balb/C avant de pouvoir obtenir un variant d'échappement pathogène [261]. Ce mutant adapté est responsable, chez la souris adulte immunocompétente, d'une pathologie proche de celle observée avec le virus sauvage chez les primates : réponse pro-inflammatoire exacerbée (avec notamment de forts taux d'INF α , MCP1, IL6), apoptose lymphocytaire, nécrose des tissus hépatiques, augmentation des valeurs sériques des

enzymes hépatiques, thrombocytopénie. La seule différence constatée entre ce modèle adapté du virus de Marburg et la pathologie induite par le virus sauvage semble être l'absence de dépôt de Fibrine dans le modèle murin, celui-ci étant une caractéristique importante dans la pathogenèse des primates avec le virus sauvage.

Au point de vue moléculaire, le séquençage des variants des Filovirus adaptés au modèle souris a révélé la présence de mutations dans les protéines NP et VP24 pour le virus Ebola Zaïre [262], et des mutations dans les séquences des protéines NP, VP30, VP35 et VP40 pour le virus de Marburg [261]. Pour le virus Ebola, ces mutations semblent liées avec l'habilité des variants viraux à contourner la réponse immunitaire innée. Concernant le virus de Marburg adapté à la souris, les données ont besoin d'être complétées pour déterminer quelles mutations précises sont à l'origine de l'acquisition de la très forte virulence. Il est d'ores et déjà intéressant de noter que la protéine VP40 subit des mutations au cours de l'adaptation, alors qu'elle est identifiée comme acteur majeur du contournement de la voie IFN de type 1. Il semble donc que la capacité à contourner la réponse immunitaire innée soit une clé du développement de la très haute pathogénicité de ces virus dans le modèle murin.

b. Le cobaye.

Depuis la découverte des Filovirus, le cobaye a été l'animal de prédilection pour leur étude. Ainsi, dès 1967, et avant même de connaître l'origine de l'épidémie à Marburg, des cobayes ont été inoculés avec du sang de patients [4] ayant succombé à cette maladie qui ne portait pas encore de nom. Ces animaux, bien que montrant une forte fièvre entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour après l'inoculation, ne succombent pas à l'infection par EBOV. Le virus a donc été soumis, de la même façon que pour la souris, à des passages en série : pour le virus Ebola, le virus sauvage a été inoculé en sous-cutané à des cobayes, et 7 jours après l'inoculation, la rate des ces animaux fut prélevée, homogénéisée, et utilisée pour inoculer de nouveaux cobayes. Ce processus fut répété jusqu'à obtenir une uniformité dans la létalité de l'infection, soit après 4 à 8 passages [263, 264]. Les variants viraux adaptés, inoculés à des cobayes, provoquent une maladie qui débute le 5^{ème} jour après l'inoculation : de la fièvre, accompagnée d'un arrêt de l'alimentation, et d'une déshydratation des animaux est observée. Le virus est retrouvé dans le foie et la rate, puis rapidement dans d'autres organes, tels que le rein, les ganglions lymphatiques, le pancréas. Le taux de virus dans le sang peut atteindre 10^5 PFU/ml [263], mais des signes hémorragiques ne sont pas constatés, bien qu'une anomalie de la coagulation ait été rapportée.

L'administration de MARV aux cobayes conduit au développement d'une maladie hétérogène avec des fièvres moyennes et la plupart des animaux survivent à l'infection. Le passage en série de ce virus chez le cobaye a également provoqué son adaptation et le développement d'une pathologie létale, uniforme chez tous les animaux infectés. De même que pour le virus Ebola, 2 à 8 passages ont été nécessaires à l'émergence de ces variants hautement pathogènes [265, 266] [267], qui provoquent la mort des animaux en 7 à 17 jours. Les cobayes perdent l'appétit, souffrent d'une forte fièvre ($> 40^{\circ}\text{C}$) et développent des oedèmes. Des désordres de la coagulation sont également rapportés. De même que pour les primates, une diminution de la température juste avant la mort a été observée.

L'analyse génétique des variants pathogènes pour le cobaye, que ce soit du virus Ebola ou du virus de Marburg, a mis en évidence des mutations dans les régions intergéniques, dans les régions non traduites, et dans les régions codantes. Notamment, concernant le virus de Marburg, 1 mutation

dans la séquence de la protéine VP40, et 3 mutations dans la séquence de la L polymérase ont été recensées[265]. Pour le variant 8 mc du virus Ebola, ont été rapportées : 2 mutations silencieuses dans la séquence de la Nucléoprotéine NP, 1 mutation dans région non codante du cadre de lecture de la protéine VP30, 1 mutation responsable de la substitution d'acides aminés dans la NP et dans la L, et 3 mutations responsables de la substitution dans VP24 [268]. Le séquençage d'un autre variant adapté, le variant K5, a également mis en évidence des substitutions dans la protéine VP24, à proximité des substitutions du virus 8mc. En outre, les travaux de notre laboratoire indiquent que les mutations de la protéine VP24 du virus Ebola sont nécessaires et suffisantes à induire la pathologie chez le cobaye [209], ce qui laisse penser que les autres mutations observées, notamment dans la séquence de la NP, apparaîtraient au cours du mécanisme d'adaptation pour induire les mutations de la VP24.

Il est intéressant de noter, que, chez le cobaye comme chez la souris, les déterminants du processus d'adaptation semblent être la protéine VP24 pour le virus Ebola et la protéine VP40 pour le virus de Marburg. Ces protéines jouent à la fois un rôle important au cours du cycle réplcatif viral, et ont une activité antagoniste de la voie IFN [29, 95-97]. Il serait intéressant de comprendre si les mutations qui apparaissent dans ces protéines au cours du processus d'adaptation ont pour but de contourner la réponse immunitaire innée du cobaye, où si elles sont plutôt nécessaires pour lier des partenaires cellulaires indispensables pour la réplication virale. Des analyses futures des interactions des protéines sauvages et « adaptées » au cobaye d'une part, et l'étude de la réponse innée du cobaye d'autre part, permettront de répondre à ces questions et de mieux comprendre les processus moléculaires à l'origine du développement de la pathogenèse chez cet animal.

iii. Le porc, un nouveau modèle ?

La découverte du porc comme hôte naturel du virus Ebola Reston [15, 48, 269] [16] laisse supposer que celui-ci pourrait aussi être utilisé comme modèle d'étude des Filovirus. Toutefois, bien que ne posant pas de problème éthique majeur, la complexité du travail sur le gros animal en milieu confiné risque de reléguer le travail sur le porc au second plan. Par ailleurs, la qualité d'un modèle dépend de sa proximité avec l'homme, et de sa capacité à « mimer » les événements qui surviennent chez celui-ci. Dans le cas du porc, bien que des troubles hémorragiques aient été rapportés lors de l'infection par l'espèce Zaïre du virus Ebola, la maladie développée semble différente et s'apparente plus à une pneumonie qu'à une FHV [49]. En particulier, les porcs ne semblent pas subir de troubles de la coagulation. Les modalités de transmission du virus entre les porcs ne sont pas encore établies, ni l'issue de la maladie, puisque lors de l'infection expérimentale par le virus Ebola Zaïre, les porcs ont été euthanasiés précocement en raison d'une trop forte détresse respiratoire. Par contre, il semblerait que les défaillances du système immunitaire du porc puissent être mises en relation avec celles observées chez l'homme, car, de la même façon que lors de cas humains, une forte diminution du taux d'IFN α a été observée rapidement après l'infection. De même, il semble que le système immunitaire du porc n'arrive pas à mettre en place une réponse humorale efficace, mais les conditions expérimentales n'ont pas permis de conserver les animaux assez longtemps pour conclure formellement sur cette observation.

Finalement, le porc pourrait être une alternative intéressante au singe pour la mise en place de stratégies de lutte contre les Filovirus (voir **Tableau 2**). Toutefois, le manque de connaissances actuelles (physio-pathologie, issue de l'infection, sensibilité aux autres souches virales – en particulier pour les autres espèces d'Ebola et Marburg, etc) ne permet pas de savoir si les résultats

obtenus chez cet animal seront transposables à l'homme et inversement. Il semble donc nécessaire de recueillir plus d'informations sur l'infection de cet animal par les Filovirus avant de le considérer comme modèle d'étude des FH à Filovirus.

Tableau 2: Comparaison des différents modèles animaux pour l'étude des Filovirus par rapport aux cas humains.

pi : post-infection. Adapté et mis à jour d'après Hoenen et al, Trends in Molecular medicine, 2006.

Critère	Modèle Souris	Modèle Cobaye	Modèle Primate Non Humain	Modèle Porc	Homme
Besoin d'une adaptation	OUI	OUI	NON	NON (pour Ebola reston et zaïre)	NON
Rash (Eruption maculeuse)	NON	NON	OUI	?	OUI
Manifestations hémorragiques	Peu profondes	NON	OUI	OUI (poumons, ganglions lymphatiques, cœur)	OUI
Troubles de la coagulation	Faibles	? données contradictoires	OUI	NON	OUI
Taux des enzymes hépatiques	Elevé	Elevé	Elevé	Non déterminé	Elevé
Thrombopénie	OUI	OUI	OUI	NON	OUI
Apoptose passive des lymphocytes	NON	NON	OUI	Non déterminée	OUI
Dérégulation de la réponse cytokinique	OUI	OUI	OUI	Suspectée (diminution du taux d'IFN α)	OUI
Décès	4-6 jours pi (EboV)	6-9 jours pi (EboV)	6-9 jours pi (EboV) 9-12 jours pi (MARV)	Non déterminé (euthanasie précoce)	6-16 jours après symptômes(EboV)
Aspects pratiques (infrastructures, coûts)	Modérés	Modérés	Complicés	Complicés	Non concerné
Aspects éthiques	Peu importants	Peu importants	Importants	Peu importants	Non concerné

2. Etude in vitro des Filovirus

i. Production de virus à partir d'ADN complémentaire

Grâce aux techniques de génétique inverse, il est maintenant possible, à partir de l'information génétique codée par un virus, de créer artificiellement des virions infectieux qui porteront les mêmes caractéristiques que les virus naturels, et dans lesquels des mutations peuvent être introduites, afin d'étudier les conséquences de ces mutations au niveau cellulaire, mais également au niveau d'un organisme entier, si on inocule ces virus mutants à des animaux. Ces virus, bien que souvent délétés pour une fonction majeure de leur pathogénicité restent classés en catégorie IV et sont donc également manipulés au laboratoire P4, tandis que les expériences de biologie moléculaire permettant de produire du plasmide codant pour le génome entier du virus d'intérêt, sauvage ou mutant, peuvent être réalisées en laboratoire de type P1/P2. La **figure 13** présente le protocole pour générer des virus recombinants, en comparaison à l'infection par un virus sauvage.

Le système de génétique inverse dont nous disposons au laboratoire est basé sur l'utilisation d'une lignée de cellules de hamster exprimant stablement la polymérase T7 (BHK-21 T7, aussi appelées BSRT7/5), qui peuvent donc, supporter l'expression de protéines virales codées par le plasmide pTM1, et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur T7. Un plasmide codant un ADN complémentaire du génome entier du virus Ebola, également sous le contrôle du promoteur T7 est transfecté. En premier lieu, cet ADNc sera transcrit par la polymérase T7, résultant en une molécule d'ARN de polarité positive simple brin, en même temps que les protéines de RNP seront synthétisées. Cet ARN positif va s'associer aux protéines virales pour former un complexe réplcatif

fonctionnel, à partir duquel toutes les protéines virales pourront être exprimées, résultant en la formation de particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules. Les virus ainsi obtenus seront amplifiés sur cellules Vero E6 puis étudiés [78, 160, 270]. Il est important de noter que l'enchaînement de toutes les étapes de répllication est un phénomène rare, et que l'obtention d'un virus recombinant est particulièrement laborieuse (pour revue, voir [271]).

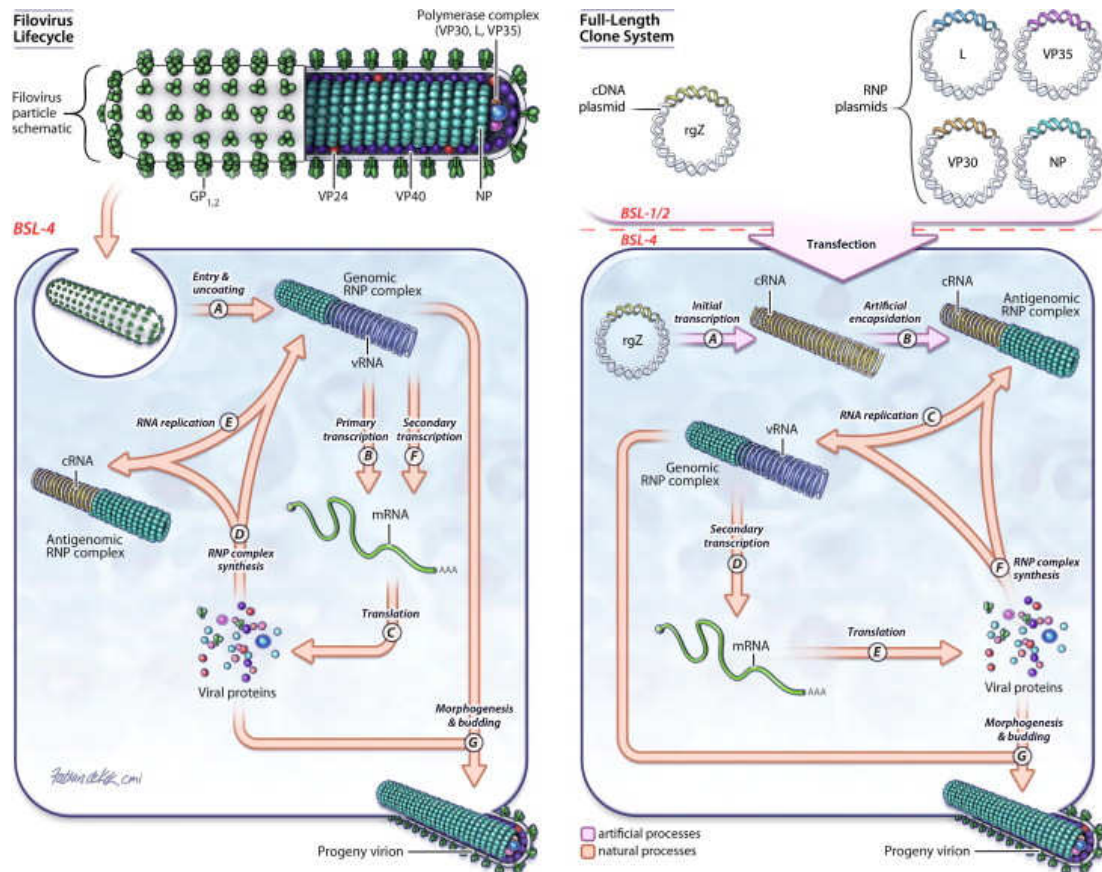


Figure 13: Comparaison de la de la synthèse de la génération de virus par génétique inverse avec le cycle réplcatif viral classique, d'après [271].

ii. Des outils pour travailler hors du laboratoire P4

La difficulté d'accès aux laboratoires P4, dont le nombre est restreint dans le monde, la complexité des règles de sécurité et le temps nécessaire à la mise en place d'expériences dans de tels laboratoires ont conduit les équipes à développer d'autres outils permettant d'étudier les Filovirus hors du laboratoire P4. Ces outils permettent en outre d'avoir une vision plus spécifique de certaines étapes du cycle réplcatif viral.

Ainsi, le système de minigénome (**Figure 14**) se montre particulièrement utile pour étudier les étapes de transcription et de répllication du génome. Tout comme la génération de virus recombinants, ce système est également basé sur la génétique inverse. Ici, les protéines de nucléocapsides sont transfectées avec un plasmide qui code pour un gène rapporteur (GFP, CAT, ou Luciférase notamment). Ce gène est flanqué de part et d'autre des régions leader et trailer du génome, normalement situées en 3' de la région non codante du gène de la NP, et en 5' de la région non codante située après le cadre de lecture de la L polymérase. Ceci permet de reproduire exactement les conditions d'expression du génome viral, et d'induire une initiation et une terminaison de

The diagram illustrates the Minigenome system within a cell. A **MINIGENOME** (a circular DNA construct with a **P_{poli}** promoter, a **T** (transcription start site), a **3'UTR**, and an **L** (late promoter) region) is introduced into the cell. It is transcribed by **Transcription par la Polymérase cellulaire** to produce a single-stranded **ARN simple brin de polarité négative** (T-3'UTR-L). This RNA is then translated by **Traduction** to produce **Protéines Virales** (VP30, VP35, NP, L). These proteins, along with the RNA, undergo **ASSEMBLAGE** to form a **Ribonucléoparticule** (RNP complex). The RNP complex enters the **NOYAU** (nucleus) for **REPLICATION**. Inside the nucleus, the RNP is transcribed by **Transcription par la L-Polymérase** to produce a viral mRNA, which is then translated by **Traduction** to produce **GFP** (Green Fluorescent Protein).

Les propriétés d'auto-assemblage et de bourgeonnement de la protéine VP40 lui confèrent la capacité à former des pseudo-particules virales, également appelées VLP (pour Virus Like Particules). Ces VLP peuvent être produites directement par transfection de cellules avec un plasmide codant pour la protéine VP40. L'utilisation de VP40 mutantes dans ce protocole permet de comprendre les mécanismes moléculaires induisant l'autoassemblage et le bourgeonnement [179]. De plus, des études ont montré la potentialisation du bourgeonnement des VLP en utilisant la protéine GP[165]. Ce système simple, rapide, se montre particulièrement efficace pour étudier les étapes tardives du cycle réplcatif viral [272]. Les VLP ainsi produites peuvent être analysées par microscopie électronique, ainsi que par des techniques de biochimie. En outre, ces particules s'avèrent être un système efficace pour l'immunisation et la protection contre les Filovirus à des fins vaccinales [273-275].

62

GP), l'encapsidation d'un minigénome dans des VLP a pu être observée. La cotransfection d'un minigénome avec toutes les protéines virales permet de s'affranchir de la présence du virus et donc de travailler hors du laboratoire P4, tout en formant des pseudoparticules virales infectieuses, porteuses du gène du minigénome, et qui seront capables d'infecter des cellules « naïves » [276]. Ce passage ne générera pas de particules infectieuses, puisque l'expression des protéines virales ne sera pas conservée. Ce système se montre particulièrement efficace pour étudier l'infectivité de particules virales, et donc les étapes plus précoces du cycle viral. En particulier, un criblage de drogue ou d'anticorps neutralisants du virus peut être envisagé hors du laboratoire P4 grâce à cet outil.

iii. Mise au point d'une lignée de chauve-souris supportant la réplication des Filovirus

Une avancée majeure de ces dernières années pour l'étude de la relation Filovirus-organisme hôte est la mise au point d'une lignée de cellules de chauve-souris [277] capable de supporter la réplication des virus Ebola et Marburg [42]. Des techniques ont été mises au point pour permettre de réaliser dans ces cellules à la fois des expériences de génétique inverse, mais également la synthèse de VLP, d'iVLP, etc. Il est intéressant de noter ici que pour favoriser la formation de virus à partir d'un clone d'ADNc, un plasmide codant pour la Polymérase T7 a été apporté en *trans*, en même temps que les plasmides codant pour les protéines de Nucléocapside (VP30-VP35-NP et L). Ceci permet d'éviter le passage dans des cellules de hamster, et donc de reproduire au mieux les conditions naturelles de conservation du virus. Ces cellules permettront certainement de mieux comprendre les mécanismes naturels de résistance à l'infection qui sont développées par les chauves-souris pour survivre en étant infectées par les Filovirus.

G. Diagnostic, Prophylaxie et Traitement

1. *Diagnostic*

Devant la haute virulence et la propagation rapide des Filovirus, la contenance de l'épidémie nécessite de pouvoir réaliser un diagnostic rapide et sûr. Les symptômes cliniques sont peu spécifiques, et de nombreux pathogènes peuvent être mis en cause, retardant la mise en place de mesures d'isolement des patients et de protection des personnels et des proches. Aussi, un effort global a été réalisé pour mettre au point des techniques rapides permettant de déterminer la présence de Filovirus. Dans un souci d'harmonisation et d'assurance qualité, des réseaux ont été créés, à l'échelle mondiale : GOARN (Global Alert and Response Network) et européenne : ENIVD (European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases). Ces réseaux ont pour but d'identifier et de confirmer rapidement les épidémies ayant une portée potentielle internationale, et de mettre en place une réponse la plus efficace et la plus rapide possible. L'envoi des échantillons à des centres de référence pour le diagnostic est favorisé, mais n'est pas toujours assez rapide. Aussi, la mise en place de procédures de diagnostic de terrain a également été développée.

Le diagnostic d'une épidémie à Filovirus en Afrique se heurte souvent à des problèmes logistiques majeurs : manque d'équipement, manque de protection, parfois même absence d'électricité pour faire fonctionner les machines nécessaires. Aussi, des techniques, rapides, employant du matériel facilement transportable, ont été mises au point. La plus répandue actuellement est la technique de RT-PCR en temps réel, qui amplifie les acides nucléiques viraux, de façon très sensible et très spécifique. Ces acides nucléiques peuvent être détectés assez rapidement, 3 jours après l'apparition des premiers symptômes, et persistent longtemps après l'infection. Cette technique possède le double avantage d'être rapide et de ne pas nécessiter de confinement après inactivation des

échantillons. Ce protocole a été largement amélioré au cours des dernières épidémies, avec addition d'étapes d'amplification, pour permettre d'avoir une meilleure spécificité (pour revue, voir [278]). Par contre, dans certains cas des contaminations croisées et des faux positifs peuvent apparaître, c'est pourquoi une confirmation par une autre technique, ou à défaut, par une 2^{ème} RT-PCR en temps réel sur une séquence nucléique différente et sur un échantillon indépendant, est souhaitée.

Une technique directe, basée sur la détection des antigènes viraux par ELISA est également disponible, mais elle nécessite de travailler en milieu confiné (enceinte portable de type 3 ou mieux, laboratoire P4). Cette technique nécessite également d'avoir à disposition des anticorps ciblés spécifiquement contre les Filovirus. Elle est donc en général préférée pour une confirmation de diagnostic, puisqu'on peut utiliser des échantillons indépendants de ceux utilisés pour la RT-PCR en temps réel.

Une autre technique, hautement sensitive, repose sur l'isolation du virus lui-même, à partir d'un échantillon de sérum ou d'organe de patient. Le virus est ensuite cultivé sur des cellules permissives (principalement Vero E6 ou MA-104, qui sont toutes deux des lignées de cellules de singe). Le virus est ensuite détecté soit par recherche d'effet cytopathique, soit par détection par immunofluorescence. Toutefois, cette technique nécessite la mise à disposition d'un laboratoire P4, et de réactifs appropriés, et par conséquent, d'envoyer les échantillons à un centre de référence disposant d'infrastructures nécessaires. Ceci va induire un rallongement de la durée du diagnostic, sans compter la dégradation possible de l'échantillon au cours de son transport. Par conséquent, ce protocole ne fait donc pas partie des techniques de choix pour le diagnostic.

Historiquement, l'analyse par microscopie électronique a été utilisée pour identifier les Filovirus [4, 7]. Mais cette technique, bien que très sensible et sûre, est très coûteuse, longue et nécessite un équipement lourd. Elle ne peut donc pas être considérée pour la mise en place d'un diagnostic rapide.

Des confirmations peuvent également être réalisées par immunohistochimie et western blot, mais là encore, la difficulté d'accès aux réactifs et aux matériels nécessaires pour ces techniques les rend difficiles à mettre en place sur le terrain.

L'analyse des marqueurs sérologiques du patient peut également être faite, dans l'idée de confirmer le diagnostic, mais, comme nous l'avons vu précédemment, des IgG et des IgM contre les Filovirus ne sont pas toujours retrouvées chez les patients, en particulier dans les cas fatals.

2. Prophylaxie

i. Protection Physique et contenance de l'épidémie

La manipulation d'agents hautement pathogènes de classe IV contre lesquels il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin ou traitement nécessite l'emploi de mesures de protection drastiques. Ainsi, ce sont équipés de scaphandres, dans des laboratoires où le niveau de confinement est maximal (portes à joints gonflants, atmosphère en dépression par rapport au milieu extérieur, SAS de décontamination pour empêcher le contact de l'air du laboratoire, potentiellement contaminé, avec l'environnement extérieur), que les chercheurs travaillent sur de tels agents pathogènes. A l'heure actuelle, il n'existe que peu de laboratoires de ce type, dont le laboratoire P4 Jean Mérieux de Lyon où une partie de mon travail de thèse a été réalisé. En outre, dans certains pays, la peur de l'apparition de cas importés d'Afrique liée à la menace bioterroriste a conduit à la mise en place de

structures de quarantaine spécialisées et d'unités de soins intensifs pour lutter contre la possible émergence d'une épidémie.

Sur le terrain, les conditions de protection sont beaucoup plus difficiles à mettre en place lors de l'apparition d'épidémies. Le premier effort important a été la diffusion d'informations destinées à éviter la contagion, via des manuels, des livres, et tout moyen de communication, y compris les chants de musiciens locaux [279-281]. Les mesures d'isolement et de protection des personnes sont la première barrière pour endiguer l'épidémie. Les recommandations portent notamment sur la façon de se protéger lorsqu'un proche est contaminé, sur les risques posés par la consommation de viande de brousse et l'importance de la cuisson de cette viande.

Aussi, le personnel soignant, après avoir été formé sur les modes de contamination et les conduites à tenir, doit se vêtir de blouses, masques, gants, et si possible de système de respirateur autonome. Toutefois, un tel apprêtement du personnel soignant est difficile à mettre en place, et peut être effrayant pour les populations mal informées [279]. Un autre moyen de lutter contre la transmission inter-humaine est l'emploi de matériel médical à usage unique, stérile, qui sera incinéré après usage. Le matériel non jetable doit être désinfecté par de l'eau de Javel ou du Glutaraldéhyde. Ces pratiques, communes dans tous nos laboratoires et nos hôpitaux, sont difficiles à mettre en œuvre en Afrique.

Un autre problème réside dans le transport des malades et des corps de patients décédés. Alors qu'il est important d'isoler les malades, leur transport depuis leur village jusqu'au dispensaire ou à l'hôpital le plus proche peut poser des problèmes de contagion importants, surtout dans les phases tardives de la maladie. De même, l'enterrement des cadavres doit être effectué, tout en respectant le deuil des proches, mais en évitant une dispersion du virus. A ce titre, des recommandations particulières ont été publiées [282].

Enfin le contrôle de l'épidémie ne peut être assuré que si un recensement systématique des cas est effectué, quotidiennement. Les dernières épidémies ont permis de définir 3 types de patients : les cas suspects (patients chez qui une fièvre apparaît brutalement, avec au moins 3 symptômes non spécifiques ou une hémorragie inexpliquée), les cas probables (ce sont des cas suspects, avec des antécédents de contact avec le virus dans les 3 semaines avant le développement des symptômes), et les cas confirmés (confirmés par analyse biologique). Le recensement de ces patients et l'enquête qui en découle permettent d'identifier les cas dits contact, qui seront suivis pendant 21 jours suite au dernier contact potentiel avec le virus. La déclaration de fin d'épidémie est possible 42 jours après la déclaration du dernier cas (soit 2 fois la période d'incubation la plus longue connue pour les Filovirus chez l'homme).

ii. Mise au point d'un vaccin contre les Filovirus

a. *Enjeux et difficultés de la recherche vaccinale contre les Filovirus*

La recherche en vaccinologie sur les Filovirus se heurte à de nombreux problèmes et enjeux socio-économiques. Tout d'abord, il est difficile d'imaginer une vaccination systématique des populations avec des vaccins contre les Filovirus, alors que les cas rapportés de contaminations humaines restent rares, en comparaison avec d'autres pathologies comme le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) par exemple. Les industriels présentent donc un faible intérêt pour le développement et la commercialisation d'un vaccin contre les Filovirus. En outre, la mise au point d'un vaccin contre les Filovirus nécessiterait de travailler en laboratoire P4 sur des modèles animaux, et en particulier sur les PNH, ce qui représente un investissement important pour les chercheurs conduisant cette recherche.

Pourtant, la possible menace d'une attaque bio-terroriste, les épisodes d'importation de personnes infectées dans les pays occidentaux, ainsi que les accidents d'exposition dans les laboratoires ont conduit les pays disposant des infrastructures nécessaires à faire un effort financier important pour favoriser la recherche vaccinale contre les Filovirus. Les populations définies comme à risque, pourraient donc se voir administrer un vaccin dans les prochaines années. Il s'agit notamment des chercheurs travaillant sur ces virus, du personnel militaire envoyé dans les zones où ces virus sont endémiques, du personnel médical directement exposé, et, dans les cas d'épidémies, de populations géographiquement proches du foyer d'émergence des virus, ce qui permettrait de contenir l'épidémie.

C'est ainsi que de nombreux vaccins ont été mis au point et caractérisés. Par opposition à d'autres types de vaccin, il est, dans le cas des Filovirus, extrêmement difficile de conduire des études cliniques pour contrôler l'innocuité et l'efficacité de ces vaccins. C'est pourquoi les données obtenues chez le singe peuvent être extrapolées pour autoriser l'emploi de ces vaccins pour un usage humain (pour revue voir [283]. A notre connaissance, une seule étude clinique a été menée, employant des plasmides codant pour la GP des virus Ebola Zaïre, Ebola Soudan, et un troisième plasmide codant pour la NP du virus Ebola [284]. Cette étude montre que le vaccin est immunogène (développement d'une réponse cellulaire de type CD4+, CD8+ et d'une réponse humorale) et qu'il n'est pas dangereux pour l'homme.

b. *Caractéristiques des différents vaccins*

◆ *Les Filovirus inactivés :*

La plus ancienne étude a visé à employer les virus inactivés [266, 285]. Ce système s'est montré efficace chez le cobaye, mais les résultats concernant les primates sont controversés [286, 287]. Les recherches conduites sur ce modèle de virus inactivé ont été abandonnées en raison de la possibilité de réversion vers une forme sauvage, active au niveau répliatif.

◆ *Les Filovirus mutants :*

D'autres approches vaccinales, favorisées par les outils de génétique inverse disponibles pour les Filovirus, consistent en l'expression de Filovirus dont une protéine est mutée ou retirée [168, 288, 289]. Ces approches, bien que protectives, et permettant la mise au point d'une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire chez le rongeur, ne peuvent pourtant être employées chez l'homme.

En effet, l'apparition de mutants d'échappement à la réponse immunitaire de ces virus, induirait la restauration du phénotype « normal », et donc potentiellement un caractère pathogène de ces virus.

◆ *Les vaccins viraux :*

Ensuite, des protocoles vaccinaux à partir de virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (Venezuelan Equine Encephalitis Virus, VEEV), utilisant un réplicon de ce virus (VRP : VEEV Replicon Particles) ont été testés. Ce réplicon est constitué du génome du VEE, dans lequel le gène d'une de ses protéines structurales a été remplacé par le gène d'une protéine des Filovirus. Ainsi, ce système, transfecté dans des cellules avec les plasmides accessoires qui contiennent les protéines structurales délétées, permet de produire assez facilement et en grande quantité des VRP, qui peuvent alors être administrées à des animaux. Plusieurs types de VRP codant pour des Antigènes issus des Filovirus ont été testés : alors que les VRP-VP24 et VRP-VP30 sont inefficaces, les VRP-VP35, VRP-NP et VRP-GP protègent des cobayes contre MARV [290]. De plus, l'utilisation de VRP-GP s'est aussi montrée protectrice chez les singes. Concernant le virus Ebola, des VRP codant pour tous ses gènes (à l'exception de celui de la polymérase) protègent des souris contre l'infection [291]. Ces souris mettent en place une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques [292], mais le sérum produit, transféré à des animaux naïfs, ne leur confère pas de protection [293]. Plus récemment dans notre laboratoire, un réplicon dérivé du Flavivirus Kunjin, exprimant la GP du virus Ebola Zaïre s'est montré efficace pour protéger des cobayes contre la forme adaptée du virus Ebola [294].

Les Adénovirus de sérotype 5 ont également été testés comme vecteur de vaccination. Au départ, ce vaccin nécessitait plusieurs injections avant de conférer une immunité robuste, puis, la stratégie de prime-boost, consistant en l'injection primaire de la GP du virus Ebola, suivie de l'immunisation par les Adénovirus codant pour cette protéine, a permis de monter une forte réponse immunitaire cellulaire, liée à de forts taux d'anticorps[295]. Une autre accélération du protocole a été possible en immunisant les animaux directement avec un adénovirus exprimant la GP du virus Ebola [296]. L'expression de protéines issues de différentes souches du virus Ebola et Marburg par ces Adénovecteurs semble en plus résulter en une protection contre les différents virus, augmentant d'autant l'intérêt pour ce vaccin [297]. De plus, il a récemment été montré que l'emploi des adénovirus de sérotype 5 pour immuniser des primates leur conférait une forte réponse CD8+ cytotoxique [298]. Mais une telle vaccination se heurte à la forte prévalence des Adénovirus de type 5 dans la population humaine, qui fait que ces virus seront certainement contrôlés par le système immunitaire de l'hôte sans pouvoir protéger contre le virus Ebola, comme cela s'est produit précédemment dans des essais de vaccination contre le VIH [299]. A cette fin, une étude récente montre que les sérotypes 26 et 35 des Adénovirus recombinants, plus rares dans la population humaine, protègent les PNH tout en échappant à la Réponse Immunitaire contre les Adénovirus recombinants de sérotype 5, laissant espérer le développement proche d'un vaccin efficace [300].

La facilité à produire des vaccins à partir de vecteurs viraux a poussé les chercheurs à explorer d'autres voies. Ainsi, des vaccins ont été produits à partir du virus Parainfluenza, et s'avèrent protecteurs et immunogènes chez le cobaye [301], mais également chez le singe [302]. Un des grands avantages de ce vaccin est son tropisme cellulaire, puisqu'il permet une administration par voie intranasale ou respiratoire dans la mesure où il infecte les cellules du tractus respiratoire. Ce virus étant largement répandu dans la population humaine, le risque d'une immunité dirigée contre

ce virus affaiblissant son efficacité vaccinale doit être pris en compte. Ainsi, une étude a montré que la réplication du virus Parainfluenza chez le cobaye est contrôlée par son système immunitaire s'il y a été exposé au préalable [303]. De façon controversée, une étude récente a montré qu'après 2 immunisations de singes rhésus préalablement immunisés par le virus Parainfluenza, une réponse protectrice contre les Filovirus est mise en place [304]. Si le phénomène est comparable chez l'humain, alors ce vaccin pourrait également être employé pour l'homme et pour les enfants, son administration par voie respiratoire en faisant un candidat privilégié lors des épidémies.

Un autre virus respiratoire a été employé pour le développement d'un vaccin contre les Filovirus, il s'agit du virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV) qui appartient à la famille des *Rhabdoviridae*, dans lequel le gène de la GP du virus Ebola ou Marburg a été introduit [305]. L'avantage du vaccin basé sur ce virus par rapport aux vaccins adéno-associés et Parainfluenza est la faible immunité de la population contre ce vecteur, ce qui laisse espérer une immunisation facile. De plus, comme pour le vaccin précédent, il est possible d'envisager une immunisation par voie orale [301, 302]. Ce vaccin s'est avéré efficace à la fois en prévention et en traitement d'urgence post-exposition chez les PNH [306-308]. En outre, son efficacité et son innocuité ont été vérifiées chez les animaux immunodéprimés [309], ce qui mime un modèle de patients atteints de défaillance du système immunitaire, comme par exemple les personnes infectées par le VIH. Un vaccin multivalent basé sur le modèle VSV, dirigé contre plusieurs souches de Filovirus, a été développé et se montre efficace [310] chez les primates, ce qui laisse espérer la protection des humains contre ces mêmes virus.

Dans une étude plus récente, des souris ont été immunisées avec le CytoMégaloVirus Murin (MCMV), exprimant un épitope de NP du virus Ebola. La vaccination a permis la production de cellules T CD8+ cytotoxiques dirigées contre la NP, tout en protégeant ces animaux contre une injection létale de virus Ebola. De plus des anticorps anti Ebola ont été observés chez les animaux vaccinés, suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire également humorale [311]. Un des principaux avantages du CMV par rapport aux autres virus employés auparavant dans des protocoles vaccinaux est sa capacité à se propager au sein d'une population, puisqu'il peut réinfecter des animaux naïfs, à partir d'animaux vaccinés. L'utilisation d'un tel vecteur présente donc un intérêt majeur pour la vaccination des singes, qui sont souvent à l'origine des contaminations humaines. Ce vaccin, une fois injecté chez un membre d'un groupe de singes pourrait alors se propager à tout le groupe pour induire sa protection.

◆ *Les vaccins à base de protéines :*

Enfin, il est possible d'envisager l'immunisation par l'emploi de VLP contenant la GP, la NP et la protéine VP40 du virus Ebola. Une étude en ce sens a montré une protection efficace de Macaques cynomolgus [273], avec la mise en place d'anticorps spécifiquement dirigés contre EBOV, ainsi que d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire efficace. Pourtant, la production de ce type de vaccin, non répliatif, est particulièrement lourde et reste donc un obstacle majeur pour sa fabrication.

Une dernière étude montre la mise en place d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire qui protège des souris contre l'injection létale d'un virus Ebola adapté. Dans cette étude, l'immunisation a été réalisée à partir d'une protéine chimère contenant les domaines extracellulaires de la GP1 et la GP2 du virus Ebola, couplés au fragment Fc d'une Immunoglobuline humaine (IgG1) [312]. Cette

étude semble faciliter l'immunisation par la GP, qui avait un effet protecteur modéré sur des cobayes à qui on avait administré une GP recombinante produite dans des cellules d'insectes [266, 313].

Mais la vaccination basée sur l'emploi de protéines présente deux inconvénients majeurs qui seront dans les années à venir un frein à la mise en place d'un vaccin anti-Filovirus de ce type : le fort coût de production, puisque ces vaccins ne sont pas répliatifs, et la nécessité d'employer des adjuvants pour favoriser la réponse immunitaire de la personne vaccinée, adjuvants dont les effets secondaires ne sont pas toujours contrôlés, comme il a été vu par le passé.

3. Essais thérapeutiques

i. Traitements symptomatiques

Comme nous l'avons vu précédemment, l'identification des Filovirus lors d'épidémies peut prendre quelques temps, pendant lequel le patient devra être pris en charge et soigné. Les recommandations médicales imposent : un traitement par des antibiotiques à large spectre, un traitement contre la malaria, l'administration de molécules analgésiques, antipyrétiques, et si besoin, une réhydratation par perfusion. Dans les phases tardives de la maladie, les défaillances des organes du patient doivent être, autant que possible, traitées. Par exemple, il s'agit de mettre en place un protocole de dialyse lorsque le système rénal est touché, ou encore de mettre le patient sous oxygène en cas de défaillance pulmonaire.

La mort des patients étant souvent liée à un choc hypovolémique dû à des troubles circulatoires, le traitement des anomalies de coagulation semble nécessaire. A cette fin, l'utilisation d'une protéine anticoagulante de Nématode (rNAPc2) a montré 33% d'efficacité chez les PNH infectés par Ebola [118] et seulement 15% dans le cas d'une infection par Marburg [253]. Ces résultats ne sont donc pas suffisants pour valider ce traitement chez l'homme. Par contre, des inhibiteurs du facteur X, ainsi qu'un substitut de la protéine C, deux protéines impliquées dans la formation du caillot sanguin [314] permettent d'allonger la durée de vie de singes infectés expérimentalement par le virus Ebola. De plus, ces molécules sont validées pour une utilisation chez l'homme dans d'autres applications. Elles semblent donc être de bons candidats pour le traitement symptomatique des infections à Filovirus.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement efficace pour lutter contre les Filovirus. Même la Ribavirine, un antiviral puissant qui cible le coiffage des ARN messagers viraux, et qui a fait ses preuves dans la lutte contre d'autres FH virales (à Bunyavirus et à Arénavirus notamment), ne s'est pas montrée efficace contre les Filovirus [315, 316]. En conséquence, les traitements couramment administrés aux patients lors d'une épidémie à Filovirus sont plus palliatifs que curatifs.

ii. Traitements spécifiques visant à bloquer la réplication virale

L'augmentation du nombre d'épisodes épidémiques au début des années 2000, liée à la crainte d'une attaque bio-terroriste utilisant les Filovirus ont favorisé l'effort de recherche visant la mise au point d'un traitement efficace contre les Filovirus. Plusieurs pistes sont actuellement à l'étude, utilisant 2 stratégies principales, soit le ciblage d'une étape clé de la réplication virale pour ralentir l'infection, soit l'augmentation de la réponse innée et adaptative de l'hôte pour favoriser sa lutte antivirale.

Dans le premier cas, les étapes répliatives pouvant être ciblées sont nombreuses : ciblage du récepteur cellulaire, inhibition de la fusion membranaire, interférence avec transcription du génome viral, ou encore avec les étapes tardives du cycle viral. A l'heure actuelle, les études les plus

prometteuses visent à intervenir sur la synthèse des protéines virales, en employant des oligonucléotides antisens ciblant les ARNm viraux [317, 318]. L'efficacité de ces molécules a été considérablement augmentée [319], avec la mise au point des PMO (phosphorodiamidate morpholino oligomers, conjugué à des peptides), qui sont plus stables qu'auparavant. On peut ainsi espérer protéger 100% des singes infectés par le virus de Marburg et traités dans l'heure, et 60% ou plus des sujets infectés par le virus Ebola [320]. Les deux problèmes majeurs que posent ce processus thérapeutique sont (i) la nécessité d'une intervention rapide après l'infection, qui dédie ces molécules principalement aux accidents de contamination (soit de laboratoire, soit dans lors d'infection accidentelle du personnel soignant), et (ii) l'absence de certitude sur l'efficacité de ces molécules tant que l'espèce virale n'est pas déterminée. En effet, la variabilité génétique des Filovirus peut être une barrière au bon fonctionnement de ce protocole thérapeutique.

La deuxième approche thérapeutique actuellement à l'étude est la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Dans ce but, l'utilisation du vaccin basé sur le VSV a montré un effet protecteur administré post-infection chez des singes infectés par les espèces zaïre[306] et soudan[307] du virus Ebola. Ce vaccin a été administré à une femme ayant eu un accident de contamination au laboratoire de Hamburg, et cette patiente n'a pas développé de signes cliniques suite à son accident. Toutefois, il n'est pas clairement établi que cette personne ait réellement été infectée [321]. Mais comme pour les PMO, cette stratégie thérapeutique nécessite d'être rapide, et de connaître l'espèce virale à l'origine de la contamination.

La dernière approche thérapeutique consiste en un transfert d'anticorps à partir de sang ou de sérum de personne convalescente. L'utilisation d'anticorps humains de personne convalescente s'est révélée efficace pour la protection des rongeurs contre l'infection [322-324]. Ce transfert s'est également montré efficace chez les PNH [325], et au cours de l'épidémie à Ebola de 1995 au Congo, des patients ont été traités par des anticorps humains et ont montré une meilleure survie [326] que les patients non traités. Toutefois, ces patients étaient des cas secondaires de l'infection, et ont reçu de meilleurs soins, ce qui peut aussi expliquer la diminution du taux de létalité. Par contre, le transfert d'anticorps issus du cheval [327], de singes rhésus [328], et d'un anticorps monoclonal humain neutralisant [329], ne semble pas protéger les PNH infectés expérimentalement par des doses létales de virus Ebola.

En conclusion, aucun traitement ne semble être à l'heure actuelle recommandable pour le traitement des FHV à Filovirus. Par contre, la combinaison de plusieurs traitements, visant à la fois à ralentir la vitesse de réplication virale et à stimuler la réponse immunitaire de l'hôte pourrait s'avérer efficace. Des études de ces combinaisons thérapeutiques, réalisées dans les modèles animaux, font à l'heure actuelle cruellement défaut pour valider un processus thérapeutique.

III. Troisième Partie : Stress Oxydatif et Infection virale, importance de la voie Keap1 – Nrf2.

A. Introduction

L'altération de l'équilibre d'oxydoréduction intracellulaire est un évènement grave, qui peut aboutir rapidement soit à la mort cellulaire, soit à des dysfonctionnements importants de la cellule, entraînant par exemple des modifications irréversibles de l'ADN. Ces modifications peuvent déclencher le processus d'immortalisation de la cellule, à l'origine de l'apparition de tumeurs ou de cancer. L'ensemble de ces perturbations de l'équilibre d'oxydoréduction est défini par le terme de stress oxydatif cellulaire.

Afin de détecter ces déséquilibres environnants de façon rapide et d'en contrecarrer les effets toxiques, la cellule mammifère est dotée d'un système de réponse ultra-performant : la voie de signalisation Keap1-Nrf2 (Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1* ; Nrf2 : *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*). Cette voie de signalisation permet de protéger l'organisme vis à vis des agents oxydants (espèces réactives de l'oxygène : ERO, agents électrophiles, etc.) qui pourraient pénétrer dans la cellule, en induisant la synthèse d'enzymes capables soit de les dégrader, soit de les modifier pour leur faire perdre leur pouvoir délétère en regard de la cellule. En particulier, un fort taux de NO, d'eau oxygénée, d'agents électrophiles et d'autres ERO va induire un dérèglement de l'équilibre d'oxydoréduction cellulaire qui sera directement détecté par les protéines de la voie Keap1-Nrf2.

La cascade d'évènements moléculaires conduisant à l'activation de Nrf2 est donc un phénomène très important, et la dérégulation de ce système va induire des troubles importants, qui sont impliqués dans le développement de différentes maladies : cancers [330], sclérose en plaques[331], maladie d'Alzheimer [332], maladie de Parkinson[333], diabète [334], maladies pulmonaires de type Broncho Pneumopathie Constructive Obstructive (BPCO) [335]. De plus, il semble maintenant établi que cette voie de signalisation est une cible importante au cours de l'infection virale.

B. Fonctionnement moléculaire

En raison de l'importance de Nrf2 dans la protection cellulaire, sa régulation ainsi que le fonctionnement de la voie de signalisation dans laquelle il est impliqué ont été extensivement étudiés. La recherche des partenaires cellulaires de Nrf2 a permis d'identifier Keap1 comme répresseur de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 [336]. Rapidement, des études ont montré que ce facteur avait un rôle modulateur de l'activité de Nrf2 [336-338] et plus tard qu'il était impliqué dans sa dégradation médiée par le protéasome [339, 340]. En l'absence de stress, Keap1 et Nrf2 interagissent au sein d'un complexe où Keap1 induit la dégradation de Nrf2 par le protéasome, *via* son ubiquitination par CUL-3 (Cullin 3) [341, 342], une ubiquitine ligase E3 qui assure la liaison des chaînes d'ubiquitine aux molécules cibles[339, 341] (**Figure 15A**).

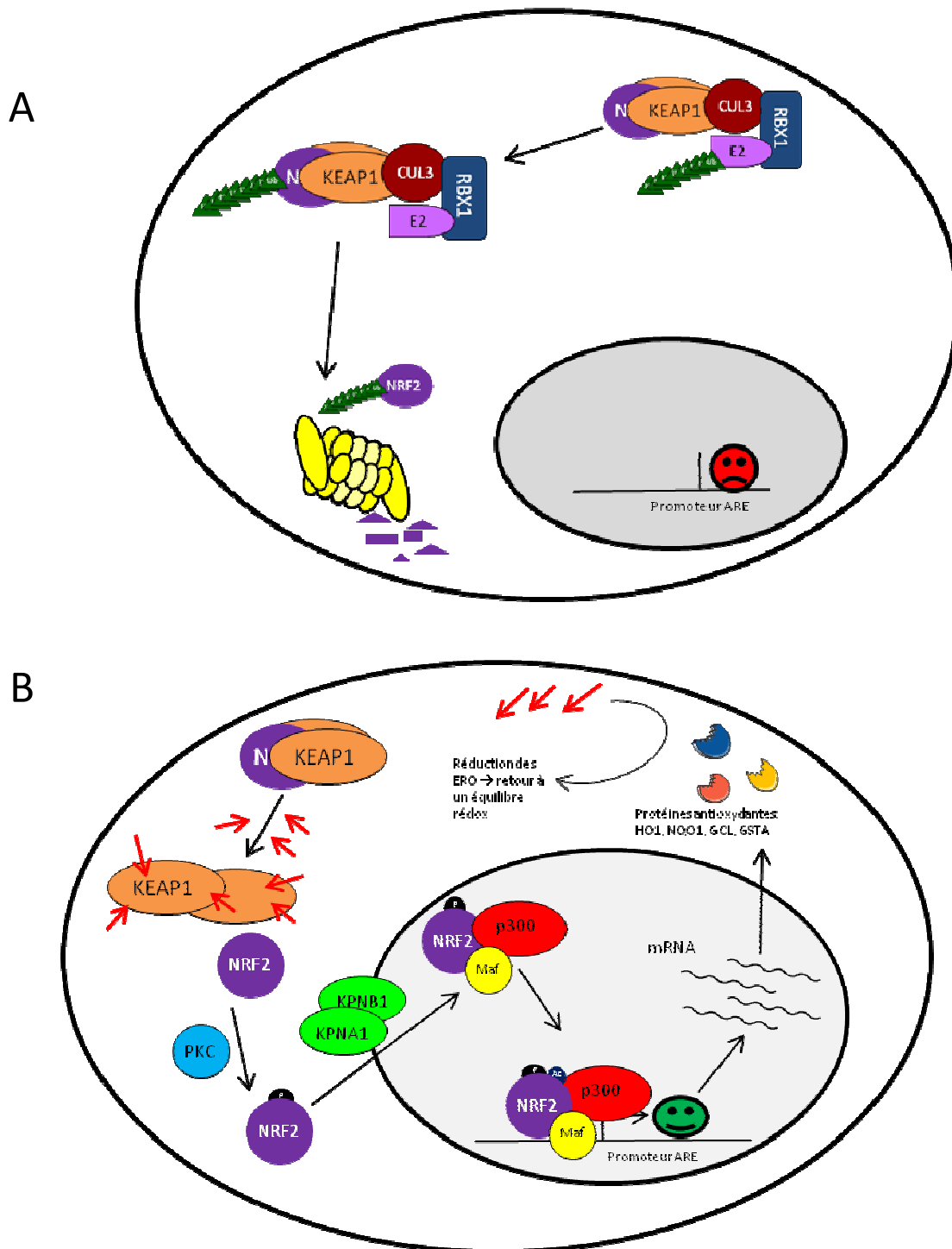


Figure 15 : Schéma simplifié de la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire médiée par Nrf2. (A) Modèle Keap1 dépendant de répression de Nrf2. En l'absence de stress oxydant, le facteur de transcription Nrf2 est lié à un homodimère de Keap1 pour permettre son ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase Cullin3 (CUL3). Nrf2, ainsi poly-ubiquitinylé, est adressé au protéasome pour y être dégradé. **(B) Activation de la transcription Nrf2-dépendante.** La présence d'ERO (flèches rouges) intracellulaires induit des modifications structurales de Keap1, qui conduisent à la libération de Nrf2, et à l'arrêt de son ubiquitination. Nrf2 est ainsi activé par phosphorylation *via* la protéine Kinase C, puis transloqué dans le noyau sous l'influence des Karyophérines alpha 1 et bêta1. Une fois dans le noyau, Nrf2 s'associe à ses co-facteurs, les Maf et la protéine p300 (responsable de son acétylation), afin de former un complexe transcriptionnel fonctionnel, qui ciblera les séquences ARE (*Antioxydant Response Element*), pour induire l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif. Les protéines ainsi synthétisées pourront alors agir pour réduire les ERO intracellulaires et détoxifier la cellule.

L'analyse de la structure de Keap1 révèle que sa séquence primaire peut être divisée en 5 domaines, de la région amino-terminale vers la région carboxy-terminale : un domaine amino terminal (NTR), un domaine BTB (pour *Drosophila* Broad-complex C, Tramtrack, and Bric-a-brac), une région intermédiaire (IVR), un domaine Kelch, constitué de 6 sous-domaines DGR (pour « Double Glycine Repeat »), et enfin d'une région Carboxy terminale, CTR (**Figure 16 A**).

Le domaine BTB est responsable de l'activation de Keap1 par homodimérisation, ainsi que de son interaction avec CUL3 [343]. Le domaine Kelch a été cristallisé [344] et il présente une structure en corolle, chaque sous-domaine DGR est structuré en feuillets β anti-parallèles qui forment un « pétale » de cette corolle (**Figure 16 B**). Cette structure est maintenue fermée grâce au domaine CTR, qui constitue un premier feuillet β , et s'associe au premier domaine DGR pour former le premier « pétale ». Cette conformation permet de lier le domaine Neh2 (Nrf2 ECH Homology) de Nrf2 par des liaisons hydrogènes [345].

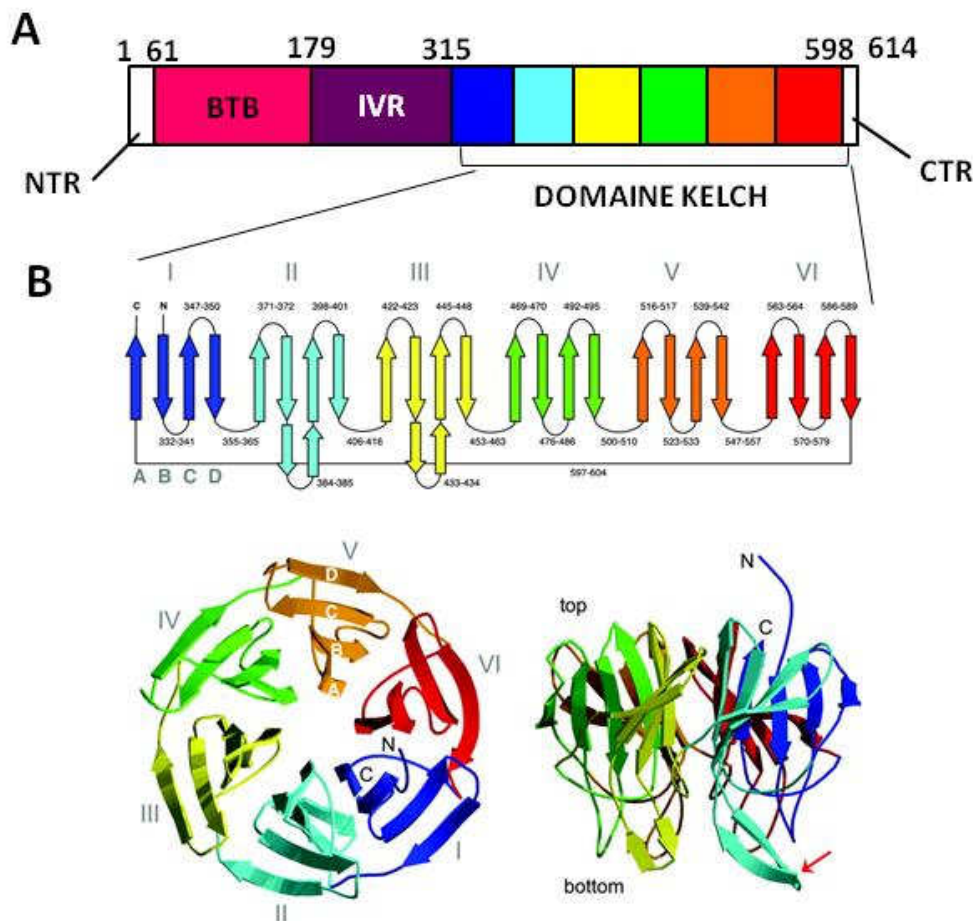


Figure 1 : Représentation schématique de la protéine Keap1. (A) Structure linéaire de la protéine Keap1 avec ses différents domaines. (B). Conformation du domaine Kelch, d'après LiX et al, 2004, JBC.

L'activation de Nrf2 est liée à la dissociation du complexe Keap1-Nrf2, qui empêche ainsi son ubiquitination et son adressage au protéasome, et induit ainsi son activation. Lorsque Nrf2 est surexprimé, la balance Keap1/Nrf2 est déséquilibrée, et l'excédent de Nrf2 produit ne peut pas être lié à Keap1. Dans ce contexte, Nrf2 est activée, comme le montrent les essais luciférase, les qPCR et western blots sur les protéines exprimées par les gènes cibles de Nrf2 ayant un promoteur ARE (*Antioxidant Response Element*) [339].

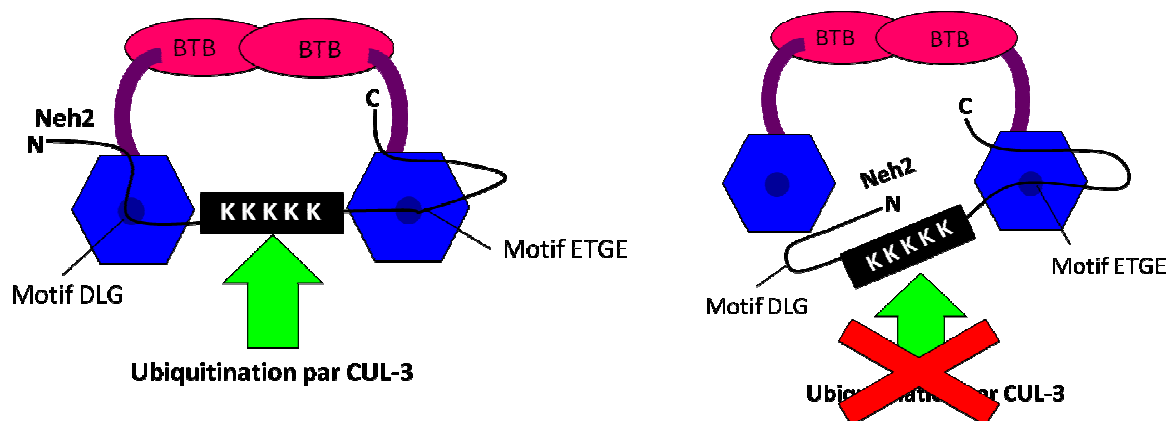


Figure 17: Modèle de double reconnaissance de Nrf2 par Keap1. A gauche, l'homodimère de Keap1 lie les deux domaines de Nrf2, DLG et ETGE, rendant ainsi les résidus Lysine du domaine Neh2 (en noir) accessibles pour l'ubiquitination. A droite, la perte d'interaction entre le domaine DLG et le domaine Kelch de Keap1 (en bleu) conduit au masquage de ces résidus Lysine, qui ne sont plus accessibles par CUL3.

Des études plus approfondies ont montré que la dissociation du complexe Keap1-Nrf2 n'est pas nécessaire pour abolir l'ubiquitination de Nrf2. En effet, des études biochimiques [346] ont montré que Nrf2 peut se lier à Keap1 par deux sites distincts : un site dit de « faible affinité » (Latch domain), dont la séquence est DLG, et un site dit de « forte affinité » (Hindge domain), dont la séquence est ETGE. De plus, ces deux sites se lient au même endroit sur la molécule de Keap1. Ainsi, le complexe moléculaire Keap1-Nrf2 fonctionnel est en fait composé de 2 molécules de Keap1 par molécule de Nrf2, ce qui a été confirmé en microscopie électronique [347]. Cette conformation tripartite permet d'étirer le domaine Neh2 de Nrf2, rendant les résidus Lysine qui le composent accessibles pour l'ubiquitination. Le dimère de Keap1 agit donc dans ce cas comme deux bras qui mettent en place le substrat de l'ubiquitination (domaine Neh2 de Nrf2) avant de le présenter à CUL3. Ce modèle moléculaire est représenté **Figure 17**.

Ce modèle pose donc la question de la forme active de Nrf2. Jusqu'ici, il était simple d'imaginer qu'une molécule de Nrf2 liée à Keap1 était inactive et qu'une molécule de Nrf2 libérée était active. Ces données suggèrent qu'une molécule de Nrf2 puisse exister sous 3 états :

- un état inactif : la protéine liée à Keap1 et étirée peut être ubiquitinée et dégradée,
- un état actif : Nrf2 est dissociée de Keap1
- un état intermédiaire : la protéine liée à Keap1 seulement par son domaine ETGE n'est pas ubiquitinable. La capacité de cette forme de Nrf2 à agir en tant que facteur de transcription reste à démontrer. Par ailleurs, un quatrième état, dans lequel Nrf2 serait lié à Keap1 uniquement par son

domaine DLG est inenvisageable, dans la mesure où l'affinité de DLG pour le domaine Kelch de Keap1 est plus faible que l'affinité de ETGE pour ce même domaine, et donc le domaine DLG ne pourra pas « naturellement » être retrouvé lié à Keap1 si le domaine ETGE ne l'est pas.

Lors d'événements oxydants, l'arrêt de l'ubiquitination de Nrf2 est causé par des modifications conformationnelles de la structure tripartite (voir **Figure 17**). Keap1 est une protéine très sensible à son environnement. En effet, l'oxydation des protéines cible spécifiquement les résidus Cystéines, induisant la formation de ponts disulfures. Des cystéines très réactives ont été identifiées dans la séquence de Keap1 [348] et forment des ponts disulfures inter- et intra-moléculaires lors de l'induction d'un état oxydatif par le traitement de cellules avec de l'eau oxygénée [349]. Ces ponts disulfures génèrent soit des Homodimères Keap1-Keap1, soit des hétérodimères de Keap1 avec un de ses partenaires, certainement la protéine CUL3. Par ailleurs, la formation de ponts disulfures intramoléculaires aboutit à des changements conformationnels de Keap1 le rendant incapable de présenter Nrf2 de façon correcte pour qu'il soit ubiquitiné. En parallèle de la formation de ces ponts disulfures, une stabilisation transitoire et réversible de Nrf2 a été observée. Ceci indique que la formation de ces ponts est défavorable à l'activité de Keap1, et par conséquent, Nrf2 n'est plus réprimé. Ce mécanisme présente 2 avantages importants pour l'induction d'une réponse anti-oxydante efficace : il apparaît comme très sensible et sa mise en place rapide permet ainsi d'induire la survie cellulaire.

La découverte de ce modèle d'interaction, avec une stœchiométrie de 2 molécules de Keap1 pour 1 molécule de Nrf2 a permis de comprendre l'effet des autres partenaires cellulaires de Keap1 sur l'inhibition de l'activité de Nrf2. En effet, de nombreuses protéines ont été identifiées comme partenaires cellulaires du domaine Kelch de Keap1, mais elles ne provoquent pas systématiquement la libération de Nrf2 du complexe. Notamment, la protéine p62, qui est impliquée dans le mécanisme d'autophagie, s'est révélée être un activateur de Nrf2 [350, 351]: elle lie la protéine Keap1 par son domaine DPSTGE [351], dont la structure est proche de celle du domaine ETGE de Nrf2. L'expression du facteur p62, qui est sous le contrôle d'un promoteur ARE, induit donc un rétrocontrôle positif sur Nrf2 [352]. p62 est responsable de la ségrégation de Keap1 au sein des agrégats cellulaires d'autophagie, ce qui inactive Keap1, et induit une forte cytotoxicité cellulaire. Inversement, l'ubiquitination de p62 dépendante de Keap1 déclenche le processus d'autophagie, pour détoxifier la cellule [353]. La prothymosine α , une oncoprotéine nucléaire, est responsable de la libération de Nrf2, en se liant au domaine Kelch de Keap1 [354]. Cela indique l'existence de complexes moléculaires Keap1/Nrf2 au sein du noyau cellulaire, un phénomène jusqu'alors ignoré. La protéine p21 agit comme inducteur de la voie Nrf2 en se liant aux domaines DLG et ETGE de Nrf2, empêchant ainsi qu'ils ne se lient à Keap1 [355]. Le domaine ETS/GE de la protéine PGAM5, un membre de la famille des Phosphoglycérate Mutases, ancrée à la membrane mitochondriale, peut également se lier au domaine Kelch de Keap1. Cette liaison résulte en la dégradation de PGAM5, par un mécanisme similaire à celui conduisant à la dégradation de Nrf2 [356]. Par opposition à p62, PGAM5 agit comme inhibiteur de Nrf2 comme l'ont montré les expériences utilisant des siRNA spécifiquement dirigés contre PGAM5 [357]. La surexpression de la sous-unité p65 du facteur NF κ B est également responsable de l'inhibition de Nrf2 [358], et cette protéine lie le domaine Kelch de Keap1. Une autre protéine impliquée dans la régulation de la voie NF κ B, I κ B Kinase bêta (IKK β) possède une séquence ETS/GE, qui lie le domaine Kelch de Keap1, mais les conséquences de cette interaction sur l'activité de Nrf2 n'ont pas été déterminées [359]. Cependant, cette interaction semble être impliquée dans la diminution de l'activité transcriptionnelle de NF κ B. Enfin deux facteurs cellulaires, Bcl-2 (B-Cell

CLL/Lymphoma 2) et FAC1 (Fetal Alz Clone 1) interagissent également avec Keap1 pour réguler le mécanisme d'apoptose [360, 361], mais les conséquences de ces interactions sur la voie Nrf2 n'ont pas été déterminées.

Une fois libéré de Keap1 (**Figure 15B**), Nrf2 est stabilisé, puisqu'il ne pourra plus être adressé au protéasome. Cette stabilisation induira sa translocation nucléaire par les Karyophérines de type $\alpha 1$ et $\beta 1$ [362]. La phosphorylation de Nrf2 par la Protéine Kinase C (PKC) a également été proposée [363] comme mécanisme important pour son activation. Il semble que cette étape soit impliquée dans la dissolution du complexe Keap1-Nrf2, mais les expériences employant un inhibiteur de PKC suggèrent qu'elle ne serait pas indispensable pour que Nrf2 exerce son activité transcriptionnelle [364].

Après translocation, Nrf2 s'associe à des co-facteurs nucléaires, dont les petites protéines Maf qui masquent ses signaux d'export nucléaire [365]. La liaison de Nrf2 à CBP (*CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) Binding Protein*) [366] est réalisée *via* deux domaines de Nrf2 (Neh4 et Neh5) qui interagissent avec deux domaines distincts de CBP, ce qui reflète une forte interaction entre Nrf2 et CBP, et une action coopératrice de ces deux facteurs. De plus, Nrf2 est acétylé par la protéine p300 pour le rendre actif [367]. Le complexe de transcription ainsi formé se fixe au niveau des séquences promotrices (ARE) des gènes cibles de Nrf2 pour induire leur expression. Des événements de dé-acétylation de Nrf2, faisant intervenir une Histone Déacétylase (HDAC2) ont été récemment mis en évidence [368, 369], mais leur action est controversée : selon certains auteurs, ils résulteraient en un arrêt de l'activité transcriptionnelle et donc en l'induction de l'export nucléaire [368], tandis que pour d'autres, la déacétylation améliorerait la stabilité de la protéine, et son accumulation cellulaire [369]. Des études futures caractérisant l'état d'acétylation sous lequel Nrf2 est exporté du noyau permettront de conclure quant au rôle de HDAC2.

Les protéines sous contrôle du promoteur ARE sont diverses. Elles ont pour fonction globale le retour à un équilibre d'oxydoréduction normal : elles prennent en charge les ERO, les neutralisent et les transforment en espèces qui sont sécrétées hors de la cellule pour empêcher d'altérer le matériel cellulaire. La NADPH :quinone oxydoreductase 1, NQO1, en est un exemple [370] : elle catalyse la réduction des quinones en hydroquinones, les protégeant ainsi d'une attaque par des électrons (portés par exemple par les ERO), qui résulterait en la libération de radicaux libres dans la cellule. L'expression de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1) est également gouvernée par un promoteur ARE dépendant de Nrf2. Cette enzyme catalyse l'oxygénation de la molécule d'Hème à partir d'un anion superoxyde $O_2^{- [371]}$, résultant en la formation de biliverdine, de NO et de fer. La biliverdine est alors convertie en Bilirubine, un anti-oxydant puissant, par la Biliverdine reductase. Le NO, quant à lui, stimulerait la Guanylate Cyclase (sGC) [372], qui possède des propriétés anti-inflammatoires. Par ailleurs, les sous-unités catalytiques et régulatrices de la Glutamate-Cystéine Ligase (GCL) sont également sous le contrôle transcriptionnel de Nrf2 [373, 374]. Ce complexe moléculaire catalyse la synthèse du Glutathion, une molécule anti-oxydante qui réduit les ponts disulfure des protéines cytoplasmiques, en agissant comme un donneur d'électron. Elle est alors oxydée en Glutathion disulfide (constitué de 2 molécules de Glutathion liées par un pont disulfure), grâce à l'action d'une Glutathion-S-transférase (GSTA1), dont l'expression dépend également de l'activité de Nrf2 [375]. Cette forme est ensuite réduite par une Glutathion réductase, recyclant ainsi le Glutathion.

Une fois la détoxification de la cellule accomplie, il est important d'arrêter la transcription et la traduction des gènes sous contrôle du promoteur ARE pour ne pas épuiser la machinerie cellulaire. A

cette fin, plusieurs mécanismes d'inhibition de l'activité de Nrf2 ont été mis en évidence. L'expression du gène de Keap1 est sous le contrôle d'un promoteur ARE [376]. En conséquence, l'activation de Nrf2 va conduire à une néo-synthèse de molécules de Keap1, qui seront rapidement en excédent par rapport à la quantité de Nrf2 intracellulaire et pourront donc permettre une restauration de l'inhibition de Nrf2, et un retour rapide à l'état basal. Cette boucle de rétroaction permet un ajustement très fin de l'activité de Nrf2. En outre, le transport nucléo-cytoplasmique de Keap1 par la Karyophérine α 6 a récemment été mis en évidence : dans les conditions physiologiques il inhiberait Nrf2 [377]. Dans ce modèle, Keap1 irait chercher la forme active de Nrf2 dans le noyau, puis grâce à son signal d'export nucléaire [354, 378-380], le complexe Keap1-Nrf2 serait relocalisé dans le cytoplasme, où la liaison à CUL3 permettrait l'ubiquitination et l'adressage de Nrf2 au protéasome. De plus, la découverte récente d'un autre inhibiteur de Nrf2, CRIF-1 (*CR6 Interacting Factor 1*) suggère que l'arrêt de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 pourrait se faire également dans des conditions de stress oxydatif [381]. Cette protéine, présente à la fois au niveau cytoplasmique et nucléaire, pourrait recruter Nrf2 actif dans le noyau et l'adresser au protéasome (**Figure 18**). Cette régulation de Nrf2 permettra le retour à un état basal où la protéine Nrf2, constamment synthétisée, sera liée à Keap1, puisque les modifications des résidus Cystéine de celui-ci ont été « réparées » sous l'action des enzymes dont la synthèse avait été activée par Nrf2.

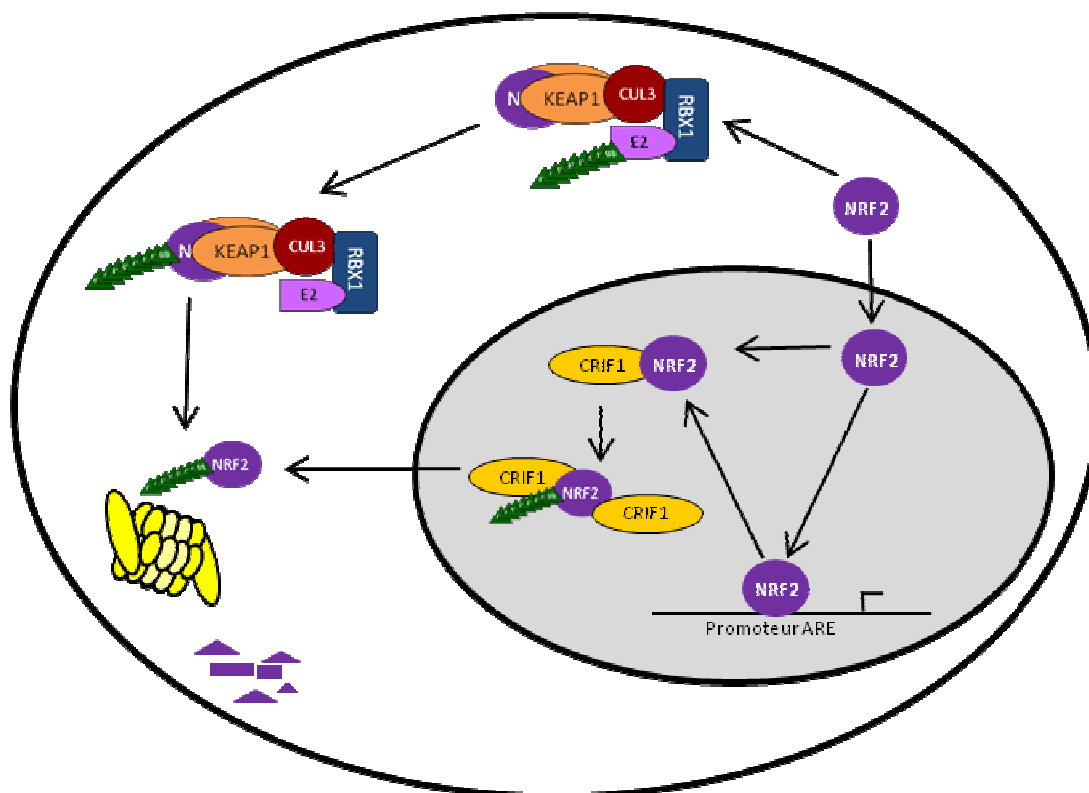


Figure 18: Devenir intracellulaire du facteur Nrf2. Deux mécanismes de régulation du taux intracellulaire de Nrf2 sont connus : une régulation cytoplasmique, dans les cellules au repos, dépendante de Keap1, et une régulation nucléaire et possiblement cytoplasmique, faisant intervenir la protéine CRIF-1 pour médier l'ubiquitination de Nrf2 et son adressage au protéasome où il sera dégradé, soit après avoir été activé, soit suite à sa translocation nucléaire.

Le facteur Nrf2 est également impliqué dans la mise en place d'une réponse immunomodulatrice. En effet, dans le modèle de choc septique induit par le LipoPolySaccharide (LPS) bactérien, Nrf2 module la réponse inflammatoire en diminuant l'action de NF κ B [382]. Une étude complémentaire réalisée dans des monocytes a montré que le LPS induit l'expression de HO1 et NQO1, qui protégeront ces

cellules d'une réponse inflammatoire excessive [383]. De plus, le $\text{TNF}\alpha$ semble aussi capable d'induire Nrf2 [384], en parallèle de son activation sur le facteur $\text{NF}\kappa\text{B}$, ce qui reflète une régulation intracellulaire de la voie inflammatoire, certainement pour protéger les cellules.

La découverte de cette modulation de la réponse inflammatoire dépendante de Nrf2, ainsi que l'importance des ERO dans le développement de la pathogénicité viro-induite ont conduit les auteurs à analyser plus en détail la relations entre les virus et la voie Nrf2.

C. La voie Keap1 –Nrf2, une cible privilégiée des infections virales ?

Le rôle du stress oxydatif dans les dommages causés par les infections virales n'est plus à démontrer : de forts taux de NO dans le sang semblent responsables des lésions vasculaires, dans les cas d'infections à virus Ebola, mais également à virus de la Dengue [385]. *In vitro*, l'augmentation du taux de Nitric Oxide synthetase (iNOS) au cours de l'infection par le virus de la fièvre catarrhale a été rapportée[386]. Ceci conduirait à une augmentation du taux de NO, responsable des dommages vasculaires eux-mêmes à l'origine de manifestations hémorragiques qui sont rapportées au cours de cette maladie. L'induction d'un cycle lytique par le virus Epstein Barr semble également corrélée à l'apparition d'ERO [387], suggérant un rôle de ces radicaux dans la pathogenèse du virus. Enfin, pour le virus de la rage, le stress oxydatif serait à l'origine de la dégénérescence neuronale[388]. Dans ce contexte, il semble important de comprendre les conséquences des infections virales sur la voie principale de réponse au stress oxydatif qu'est la voie Nrf2.

Des études récentes ont montré l'induction par certains virus soit de l'activation de Nrf2 et potentiellement de la survie cellulaire, soit de l'inhibition de Nrf2, conduisant à une mortalité cellulaire précoce qui faciliterait la libération des particules virales.

En particulier, dans le cadre d'infections par des rétrovirus, la mort des cellules du système nerveux central est impliquée dans le développement de troubles de démence et semble causée par une dérégulation de l'équilibre d'oxydoréduction au niveau cellulaire [389]. Un modèle animal utilisant le mutant ts1 du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) a permis de reproduire un syndrome de type SIDA chez la souris. En augmentant les réponses anti-oxydantes des cellules, les astrocytes chroniquement infectés par ce virus survivaient mieux. Ils semblaient en effet protégés contre les dommages oxydatifs causés par l'infection virale, notamment grâce à l'induction de la voie Nrf2 [390]. Ainsi, le traitement de la démence résiderait dans l'utilisation de molécules anti-oxydantes, qui, bien que n'éliminant pas le virus, permettraient de protéger les cellules nerveuses des dommages oxydatifs causés par l'infection virale. Deux molécules, le Galavit [391, 392] et la Minocycline [393], se sont montrées efficaces pour activer la voie Nrf2 dans les astrocytes, favorisant leur survie en réponse à l'infection par le MoMuLV. L'analyse des thymocytes et des cellules T du tractus intestinal d'animaux infectés par ce virus et traités par le Galavit a montré que l'action protectrice anti-oxydante de cette molécule est également visible au niveau de ces organes, et que cette molécule, *via* l'induction de la voie Nrf2, pourrait préserver les cellules T de la cytotoxicité virale[394, 395]. Ces résultats très prometteurs permettent d'espérer la mise en place d'un traitement visant à ralentir la réplication virale des rétrovirus (dont le VIH), basé sur l'induction de la voie Nrf2 qui protégerait les cellules des dommages induits par ces virus. Une étude montre en outre que le stress oxydant observé lors de l'infection par le VIH serait causé par la protéine Tat, et son activité de *trans*-activation des LTR du VIH. L'induction de Nrf2 inhiberait cette activité de Tat [396],

expliquant potentiellement le mécanisme de ralentissement de la réplication des rétrovirus observé lors de traitements avec des inducteurs de Nrf2.

Mais les rétrovirus ne sont pas les seuls virus sensibles à l'activation du facteur Nrf2. En effet, dans un modèle murin d'infection par le Virus Respiratoire Syncytial (RSV), des souris dont le gène de Nrf2 est inactif (Nrf2^{-/-}) étaient plus susceptibles à l'infection virale, alors qu'un pré-traitement avec un inducteur de Nrf2, le Sulforaphane, limitait la réplication virale et l'inflammation viro-induite [397]. De plus, les analyses réalisées sur des lavages bronchio-alvéolaires murins, et les sécrétions nasopharyngées ont montré une diminution du taux d'expression de Nrf2, ainsi que des enzymes anti-oxydantes chez les sujets infectés par rapport aux sujets non-infectés [398]. Cette découverte met en lumière une inhibition de la réponse anti-oxydante par le RSV, qui pourrait jouer un rôle important dans l'infection pulmonaire aiguë causée par ce virus, notamment chez les jeunes enfants.

Bien que la modulation de la voie Nrf2 par le virus de la grippe n'ait pas été analysée, une étude a révélé que l'activation de Nrf2 dans les cellules inhibe l'entrée et la réplication de ce virus [399] mettant en lumière les propriétés antivirales de Nrf2. De plus, chez des souris Nrf2^{-/-}, le développement du syndrome de la grippe semblait plus grave que chez des souris sauvages [400].

Les virus responsables des hépatites semblent également moduler la voie Nrf2 mais les données actuelles sont controversées, et il est difficile d'établir un consensus à partir de la littérature disponible. Le virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV), un virus à ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des Calicivirus sert de modèle pour l'étude des hépatites fulminantes : il induit une diminution des enzymes anti-oxydantes dans la cellule, ce qui conduit à une toxicité cellulaire. Cet effet du virus toxique semble contrecarré par l'administration de Mélatonine [401], une molécule protectrice du foie qui active Nrf2 et protège les macromolécules contre les méfaits du stress oxydatif [402]. Ce traitement résulte en une stabilisation des taux intracellulaires de Nrf2, et une augmentation de son activité, ce qui induit finalement la diminution des dommages hépatiques causés par le RHDV.

Par ailleurs, la protéine HBx du Virus de l'Hépatite B (VHB) est responsable de la diminution d'expression d'enzymes de détoxification de type II, mais cette activité semble indépendante du facteur Nrf2 [403]. De plus, dans une lignée hépatique cellulaire exprimant constitutivement le génome du VHB, la voie Nrf2 est activée [404], ce qui conduit à une meilleure protection de la cellule contre l'attaque de molécules oxydantes par rapport aux cellules non-infectées. Toutefois, il est raisonnable de penser que, dans les cas d'infection chronique par le VHB, l'activation de Nrf2 dans les cellules infectées serait un moyen d'induire la survie cellulaire, et potentiellement le processus d'immortalisation des cellules infectées conduisant au développement du cancer du foie.

Une étude réalisée avec le Virus de l'Hépatite C (VHC) a montré que l'activité de Nrf2 augmente au cours de l'infection [405]. La protéine Core du VHC semble être responsable de l'augmentation du taux des ERO dans le foie, et compromettrait l'activation des anti-oxydants par le fer dans un modèle souris et dans des cellules humaines, mais ceci serait indépendant du facteur Nrf2 [406]. Pourtant, dans un modèle *in vitro*, le traitement de cellules par le Fer induit la synthèse d'HO1 de façon dépendante de Nrf2, et diminuerait l'expression des gènes du VHC [407]. De même, le traitement par un dérivé de la Silymarine, puissant anti-oxydant activateur de Nrf2 [408] diminue l'expression des protéines core et NS5A du VHC dans des cellules exprimant son génome [409]. Enfin, dans l'étude la plus récente, l'utilisation de cellules où se réplique le génome du VHC met en évidence l'inhibition de

l'expression des gènes sous contrôle du promoteur ARE, mécanisme corrélé à une diminution du taux nucléaire de Nrf2, causée par une relocalisation cellulaire de cofacteurs de Nrf2, les Maf, qui sont importants pour sa liaison aux promoteurs ARE [410]. Le mécanisme moléculaire induisant la relocalisation des Maf au cours de l'infection par le VHC n'est pas compris. Les données semblent donc contradictoires et montrent deux effets opposés des protéines du VHC sur la voie Nrf2. Dans ces études, les systèmes de détection, les cellules employées et les lignées construites varient. De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle d'infection cellulaire par le VHB et le VHC. Ces paramètres majeurs ont vraisemblablement un fort impact sur le résultat des études, et il est difficile de comprendre l'interaction entre la voie Nrf2 de détoxification cellulaire et les virus des Hépatites.

Enfin, lors d'infection à virus Ebola, des taux de NO élevés dans le sang ont été rapportés. L'induction d'un stress oxydant des cellules environnantes, bien que non démontrée à l'heure actuelle, est fortement suspectée.

En regard des connaissances actuelles et des études récentes, il semble que la voie Keap1-Nrf2 soit une cible importante pour les virus, et que, de la même manière que la voie IFN, son activité se doit d'être modulée pour permettre une réplication virale efficace. Toutefois, aucune donnée moléculaire sur l'action précise des virus sur la voie Nrf2 n'est disponible à l'heure actuelle. Pourtant, l'identification détaillée de ces mécanismes permettrait certainement de comprendre l'importance du ciblage de la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire dans le développement de la pathogenèse virale.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les Filovirus sont à l'origine de FH graves chez l'homme et les primates, et, à l'heure actuelle il n'existe aucun vaccin ou traitement pour contrer ces agents. L'établissement d'une stratégie efficace pour contrôler ces virus et empêcher le développement d'épidémies mortelles nécessite de mieux comprendre les mécanismes qui régissent leur très forte pathogénicité. En particulier, la modulation des réponses cellulaires de l'hôte par les protéines virales semble être le phénomène clé du développement de la pathogenèse. Ainsi, l'étude de l'effet des protéines virales sur la physiologie cellulaire est indispensable.

Des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension des différentes fonctions qu'exerce la protéine VP24 d'EBOV : outre son rôle de protéine structurale et son importance dans le cycle réplicatif, cette protéine présente un intérêt particulier puisqu'elle gouverne l'adaptation à un nouvel hôte et contrôle la réponse à l'Interféron, qu'elle inhibe. Ces deux rôles de la VP24 permettent de la définir comme un facteur de virulence. Toutefois, en dépit des similarités de séquence entre les VP24 des virus EBOV et MARV, MARV semble fonctionner différemment, faisant intervenir la protéine VP40 dans le contrôle de l'adaptation et de la réponse à l'IFN, et la VP24 ne semble pas impliquée. Le rôle de la VP24 de MARV dans la cellule infectée nécessite donc d'être étudié plus en détail.

- Afin de mieux comprendre les fonctions de la VP24 de MARV, il est important d'identifier ses partenaires cellulaires. Dans ce but, nous avons réalisé un crible double hybride en levures qui a généré une liste d'interactants potentiels de la VP24. Notamment, nous avons identifié une protéine qui est impliquée dans la réponse cellulaire au stress oxydatif.
- Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à comprendre les conséquences de l'interaction entre VP24 de MARV et cette nouvelle cible, en regard de la réponse anti-oxydante cellulaire. Pour ce faire, nous avons tout d'abord identifié le domaine protéique de la cible impliqué dans la liaison à la VP24, puis analysé les conséquences de la présence de VP24 sur le fonctionnement de cette protéine, et plus généralement sur la modulation de la réponse au stress.
- Compte tenu de l'homologie de séquence qui existe entre les protéines VP24 des virus EBOV et MARV, nous avons alors souhaité évaluer l'implication de la VP24 d'EBOV dans la modulation de la réponse anti-oxydante cellulaire.

RESULTATS

1ERE PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS DE MARBURG AGIT COMME UN ACTIVATEUR DE NRF2, EN CIBLANT LA PROTEINE KEAP1

Le rôle joué par la protéine VP24 au cours de l'infection par MARV reste mal compris. Les travaux de Bamberg ont mis en évidence son rôle fondamental au cours de l'infection, et, de même que pour la VP24 d'EBOV[204], cette protéine possède les propriétés d'une protéine de matrice : oligomérisation, association aux membranes, interaction avec la NP[205]. De plus, autant pour MARV que pour EBOV, ces deux protéines jouent un rôle important dans l'assemblage des RNP virales et leur condensation [205, 209].

De précédents travaux, en collaboration avec notre laboratoire, ont mis en évidence un rôle important de la protéine VP24 du virus Ebola dans le contournement de la réponse antivirale de la cellule [95-97]. De même, cette protéine est un facteur important pour le développement de la pathogenèse chez un nouvel hôte, puisque les virus Ebola dits adaptés aux rongeurs portent des mutations dans le gène de la VP24 [262, 411] qui sont nécessaires et suffisantes pour rendre le virus létal chez le nouvel hôte. Au final, la protéine VP24 d'EBOV semble être un facteur de virulence majeur. Toutefois, lors de l'infection par MARV, la protéine VP40 exerce une action similaire : elle bloque la phosphorylation des Janus Kinase [29], résultant en l'inhibition de l'expression des protéines antivirales en réponse à l'IFN. En outre, des mutations dans la VP40 sont également à l'origine du développement de la pathogénicité dans le modèle rongeur [261]. Pour MARV, il semble donc que ce soit la VP40 qui joue le rôle de facteur de virulence qui avait été défini pour la VP24 d'EBOV.

Les similitudes de séquences entre les deux VP24, ainsi que le caractère multifonctionnel de la VP24 d'EBOV nous ont suggéré l'existence d'autres fonctions pour la VP24 de MARV. Afin d'identifier ces fonctions, nous avons utilisé une approche générale pour identifier les partenaires cellulaires putatifs de la VP24 de MARV.

Identification de la protéine Keap1 comme partenaire cellulaire de la protéine VP24 de MARV.

L'identification des partenaires cellulaires potentiels de la VP24 de MARV a été réalisée par un crible double hybride en levures (voir **Figure R1 A**). La séquence codant pour la VP24 de MARV a été clonée dans le plasmide pPC97, qui permet de générer des protéines recombinantes fusionnées au domaine Gal4BD (Gal4 Binding Domain) et qui s'expriment en levures. Le plasmide obtenu a été utilisé pour transformer des levures de type AH109 (signe sexuel Mat a, qui ne poussent pas en absence de Leucine, d'Histidine et de Tryptophane) par la technique décrite par Gietz et Wood [412]. La présence du plasmide pPC97 permet à ces levures de croître en absence de Leucine, ce qui a permis de sélectionner les levures transformées. Les levures "appâts" ainsi obtenues ont été analysées pour leur capacité à transactiver et à produire des faux positifs. En effet, la transactivation induit l'expression du gène His3 (Imidazole phosphate déshydratase) en l'absence des deux ou d'une des deux cassettes nécessaires à son activation (Gal4AD et Gal4BD, respectivement portées par les

plasmides pPC86 et pPC97). En conséquence, les cellules sont capables de pousser sans Histidine dans le milieu de culture. Pour ce test, les levures transformées, en phase exponentielle de croissance ont été ensemencées sur milieu sélectif SD Leu⁻ His⁻, et en présence de drogue inhibitrice du gène His3 (3AT: 3-amino-1,2,4-triazide imidazoleglycerol phosphate dehydratase) à des concentrations croissantes. La plus basse concentration de 3AT inhibitrice de la croissance des levures appât a alors été employée pour réaliser le crible.

Les levures proies, Y187, de signe sexuel Mat α , préalablement transformées, nous ont été fournies par l'équipe IMAP (INSERM U851). Ces levures portent un plasmide pPC86, généré par stratégie de clonage Gateway, qui code pour un ADNc de rate humaine, fusionné au domaine Gal4AD (Activation Domain). La présence des deux domaines Gal4AD et Gal4BD est indispensable pour restaurer la capacité des levures à activer le gène His3 et donc à croître en absence d'histidine (**Figure R1 B**).

Les levures appâts et proies ont ensuite été conjuguées, et le produit de la conjugaison cultivé sur milieu sélectif sans Tryptophane, sans Leucine, sans Histidine et en présence de 3AT, à la concentration prédéfinie par le test de transactivation. Ces levures ont été cultivées 10 jours, puis répliquées six fois sur milieu sélectif frais, tous les 3 jours, afin d'éliminer les faux positifs. En parallèle, l'efficacité du crible a été évaluée en mesurant le nombre de colonies diploïdes, c'est-à-dire porteuses des deux plasmides (pPC97 et pPC86), par croissance sur milieu sélectif sans Leucine et sans Tryptophane. Le crible a été validé par ce test où plus de 15×10^6 clones de levures ont été recensés.

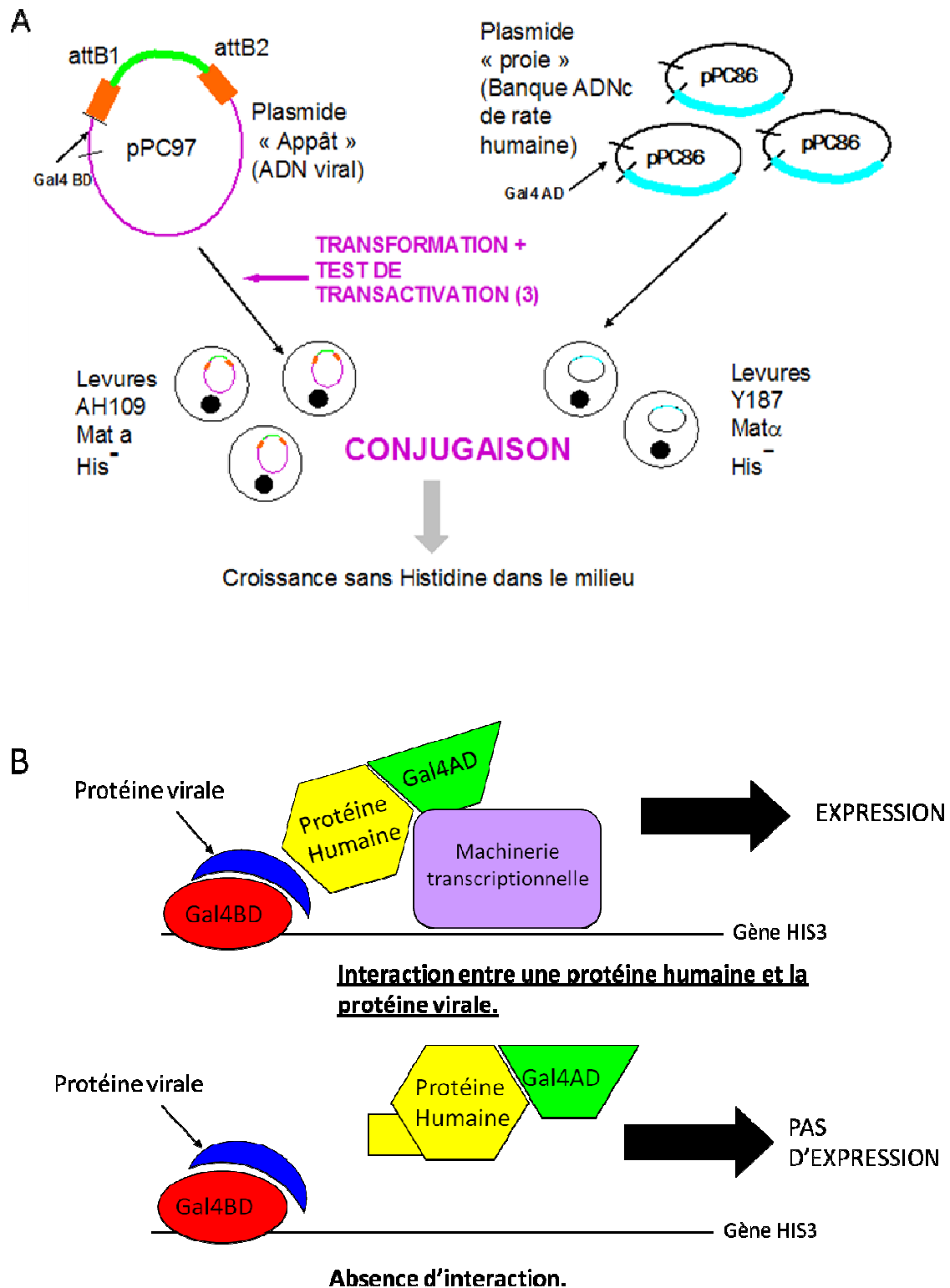


Figure R1: Principe du crible double hybride. (A) Technique du crible double hybride. Le crible double hybride repose sur la conjugaison entre deux souches de levures de signes sexuels opposés. Une souche Mat a (souche appât) est transformée par un plasmide codant pour une protéine connue (dans notre cas, la protéine VP24 de MARV), tandis qu'une souche Mat α (souche proie) est transformée par un plasmide contenant un ADNc d'une banque (de rate humaine). Si les deux protéines codées par ces plasmides interagissent dans la levure diploïde qui résulte du croisement, l'auxotrophie pour l'Histidine est restaurée. Les colonies de levure ainsi obtenues sont analysées pour séquencer l'ADNc contenus dans le pPC86. (B) Expression du gène His3 de la levure, par activation du promoteur Gal4 sous l'action des protéines Gal4AD (Activating Domain) et Gal4BD (Binding Domain). Un rapprochement spatial suffit au recrutement de la machinerie transcriptionnelle, ce rapprochement étant médié par l'interaction entre les protéines virale et humaine.

Au final, le crible a donné 125 clones de levures, qui ont été lysés et pour chacun, la séquence des ADNc codés par le pPC86 a été amplifiée, puis séquencée. Les produits de séquençage ont été alignés contre la base de données NCBI, en réalisant un BLAST, pour identifier les protéines humaines impliquées. Les résultats des BLAST sont représentés dans le **tableau R1**.

Interactor	Number of hits	Occurrence (%)	Accession number	Involved in	Full name
KEAP1	60	63,83	NP_036421	Oxidative stress	kelch-like ECH-associated protein 1
ROCK1	2	2,13	NP_005397	Cytoskeleton	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
SRRM2	1	1,06	NP_057417	RNA Splicing	splicing coactivator subunit SRm300
KIAA1109	2	2,13	XP_371706	Autoimmunity	KIAA1109 - similar to CG15133-PA isoform 1
NIPBL	1	1,06	NP_597677	Cell Division	delangin isoform A
TBC1D1	2	2,13	NP_055988	Metabolism	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1
GOLGA1	2	2,13	NP_002068	Golgi Structure	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1
B2M	1	1,06	NP_004039	Immunity	beta-2-microglobulin precursor
CADPS2	1	1,06	NP_001009571	Neuronal Synapse	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2 isoform b
RRM2B	2	2,13	NP_056528	DNA Synthesis	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
MXRA5	1	1,06	NP_056234	Matrix	matrix-remodelling associated 5
CCDC88	5	5,32	NP_115627	Cytoskeleton	coiled-coil domain containing 88
RANBP2	1	1,06	NP_006258	Nuclear Pore	RAN Binding Protein 2
PGK1	1	1,06	NP_000282	Metabolism	Phosphoglycerate kinase 1
GUSBL2	1	1,06	EAW50463	Metabolism	glucuronidase, beta-like 2, isoform CRA_d
SMAD1	1	1,06	NP_005891	Cell Behavior	SMAD family member 1
MMRN2	3	3,19	NP_079032	Extracellular protein	Multimerin 2
TNFRSF14	1	1,06	NP_003811	Cell Surface Protein	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
SEC31A	1	1,06	NP_001070676	Intracellular transport	SEC31 homolog A isoform 3
PGAM5	1	1,06	XP_001126125	Metabolism	phosphoglycerate mutase family member 5
NIT1	1	1,06	NP_005591	Tumor Suppressor	nitrilase 1
CTBP2	1	1,06	NP_073713	Cell Division	C-terminal binding protein 2 isoform 2
GOLGA2	1	1,06	NP_004477	Golgi Structure	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2
IGHG1	1	1,06	AAH72419	Immunity	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
TOTAL 1:	94				
No hit	31	24,8			
TOTAL:	125				

Tableau R1. Liste des partenaires cellulaires potentiels identifiés par le crible double hybride en levures pour la protéine VP24 de MARV.

La fréquence d'apparition de ces partenaires dans le crible est indiquée. L'identification des protéines humaines a été réalisée grâce à un alignement de séquence avec le programme BLAST (NCBI). Parmi les 125 colonies obtenues, 31 n'ont montré aucune similitude avec une protéine humaine (No hit), et les résultats obtenus pour les 94 colonies restantes sont présentés.

De façon remarquable, la protéine humaine Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein 1*) est la plus représentée, puisqu'elle apparaît dans 60 clones, soit à une fréquence de 63,83%. Keap1 joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse cellulaire au stress oxydant, en séquestrant le facteur de transcription Nrf2 pour empêcher son activité anti-oxydante. De plus, Keap1 possède des résidus Cystéines très réactifs qui sont la cible des ERO et agit par conséquent donc comme un détecteur du stress oxydant. Enfin, le stress oxydant est un mécanisme majeur de réponse aux attaques microbiennes. Nous avons donc décidé de nous intéresser plus particulièrement à cette protéine et l'avons définie comme cible principale de notre étude.

Les résultats de séquençage ont fourni différentes séquences du gène Keap1, et nous avons pu identifier le fragment de gène le plus court permettant l'interaction entre Keap1 et VP24, entre l'acide aminé 324 et l'extrémité carboxy-terminale de Keap1 (Voir **Figure R2**). Ainsi, la région de Keap1 qui semble lier la VP24 se superpose au domaine Kelch, lui-même impliqué dans l'interaction entre Keap1 et Nrf2.

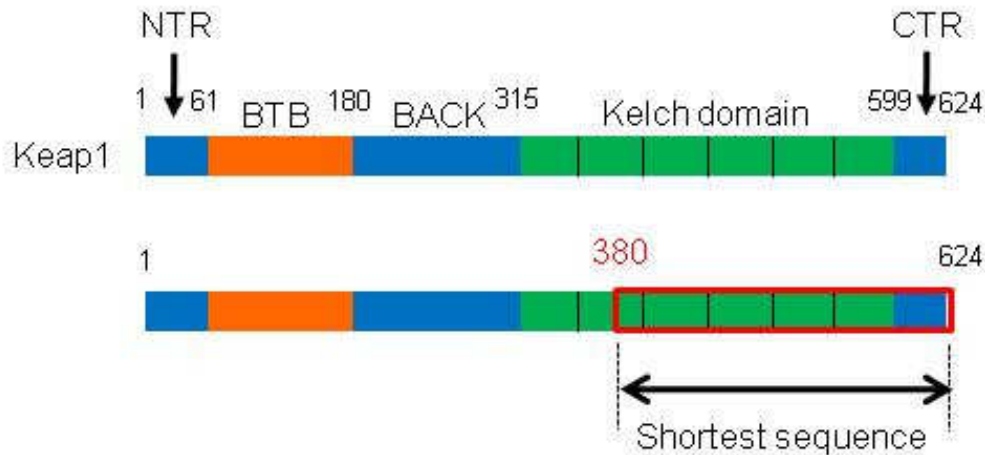


Figure R2. Représentation schématique de la protéine Keap1 et de son domaine possible de liaison à la VP24. Keap1 est composée d'une région Amino terminale (NTR, résidus 1 à 60), d'un domaine BTB (Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex domain, résidus 61 à 180), d'une région intermédiaire (IVR, résidus 181 à 314) et d'un domaine Kelch (résidus 315 à 599) qui s'associe avec l'extrémité carboxy-terminale (CTR, résidus 600 à 624). Le séquençage des produits de crible double hybride en levure indique que les résidus 380 à 624 sont suffisants pour lier la protéine VP24.

La forte fréquence de Keap1 dans notre crible double nous a conduits à analyser son interaction avec la protéine VP24 de MARV de façon plus approfondie. Nous avons tout d'abord confirmé cette interaction dans des cellules mammifères, par des techniques d'immunoprécipitation en condition de transfection. Des protéines VP24 de MARV, recombinantes, marquées avec une étiquette myc (soit à l'extrémité amino, soit à l'extrémité carboxy-terminale) ont été sur-exprimées seules, ou conjointement à la protéine cellulaire Keap1 dans des cellules 293T. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation a été réalisée en employant un anticorps dirigé contre l'étiquette myc, en utilisant le kit μ MACS c-myc tagged Protein Isolation kit (Miltenyi). Les extraits cellulaires et les produits d'immunoprécipitation ont ensuite été analysés par western blot (**Figure R3A**). Alors que la protéine Keap1 exprimée seule n'est pas retrouvée dans les immunoprécipités, dans ceux générés avec la protéine VP24-myc, Keap1 est retrouvé. Ceci témoigne d'une interaction spécifique entre la VP24 et Keap1. Ce résultat est le même quelque soit l'extrémité où la VP24 est étiquetée. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une Immunoprécipitation réciproque, c'est-à-dire que nous avons surexprimé la VP24 de MARV avec la protéine Keap1 recombinante, portant une étiquette myc à son extrémité amino-terminale. L'immunoprécipitation anti-myc a confirmé le résultat précédent puisque nous retrouvons la VP24 dans les Immunoprécipités uniquement en présence de Keap1 (**Figure R3B**).

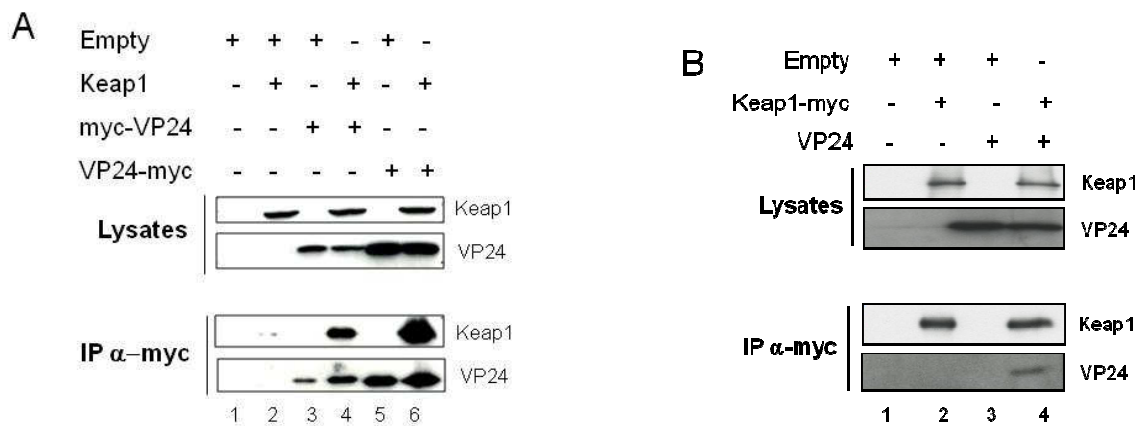


Figure R3. La protéine VP24 interagit avec Keap1. (A) la protéine recombinante VP24 fusionnée à un épitope myc à son extrémité amino- (myc-VP24), ou carboxy- (VP24-myc) terminale a été surexprimée avec Keap1 dans des cellules 293T. 24h après transfection, les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-myc. Les immunoprécipités et les lysats cellulaires ont été analysés par western blot pour Keap1 et VP24. (B) : La protéine myc-Keap1 a été surexprimée avec la VP24 en cellules 293T. Les cellules ont ensuite été lysées et analysées de la même façon que dans (A).

Nous avons alors tenté de savoir si la protéine VP24 interagissait avec la protéine Keap1 endogène. Pour ce faire, nous avons surexprimé la protéine VP24 flanquée d'une étiquette myc à son extrémité carboxy terminale, ou la protéine VP35 aussi marquée par une étiquette myc, comme contrôle négatif. 24h après transfection, les cellules 293T ont été lysées et les lysats immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-myc. Le produit d'immunoprécipitation a été élué dans un faible volume afin de concentrer les protéines. Les protéines retrouvées ont été analysées par western blot avec un anticorps dirigé contre Keap1 (**Figure R4**). Dans la mesure où la concentration de Keap1 est trop faible dans les cellules pour permettre son marquage par western blot sur les lysats cellulaires, nous avons utilisé un lysat de cellules 293T transfectées par Keap1 comme contrôle (puits 1). La protéine endogène Keap1 est spécifiquement retrouvée dans les Immunoprécipités générés par la VP24-myc, mais pas dans ceux générés par la VP35 d'Ebola, témoignant de la force de l'interaction entre Keap1 et VP24.

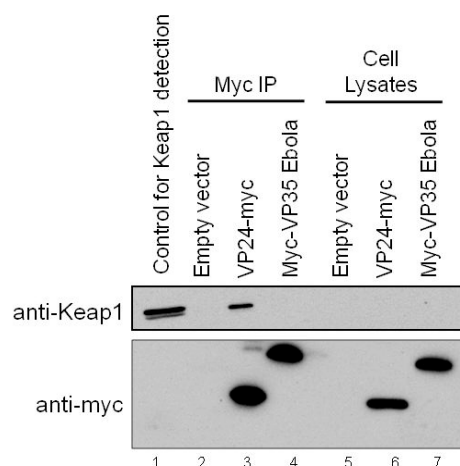


Figure R4. La VP24 de MARV interagit avec la protéine Keap1 endogène. Les protéines VP24 de MARV et VP35 d'EBOV, fusionnées à une étiquette myc ont été exprimées dans des 293T. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et les lysats soumis à une immunoprécipitation dirigée contre un anticorps anti-myc, suivie d'une analyse par western blot avec un anticorps anti-myc et un anticorps anti-Keap1. Puits 1: contrôle de la détection par un anticorps anti-Keap1, en utilisant un lysat de 293T dans lesquelles Keap1 avait été surexprimé.

La localisation cellulaire de la protéine VP24 de MARV a été peu étudiée jusqu'ici [205]. Nous avons tiré avantage de la disponibilité d'un sérum polyclonal de lapin capable de reconnaître la VP24 pour analyser sa localisation intracellulaire en conditions de transfection, seule ou en présence de Keap1. Pour ce faire des cellules Vero ont été transfectées avec le plasmide pHCMV-VP24MARV, pSPORT6-Keap1, individuellement ou en combinaison. 16h post-transfection, les cellules ont été fixées puis les protéines d'intérêt marquées par des anticorps spécifiques. L'utilisation du sérum polyclonal de lapin reconnaissant la VP24 a nécessité une étape préalable de clarification afin d'éliminer partiellement le bruit de fond qu'il génère. Brièvement, il a s'agit de fixer des cellules Vero non transfectées par une solution à 4% de PFA, avant de les perméabiliser par une solution de Triton X-100 à 0,1%. Le sérum polyclonal, dilué au $1/10^{\text{ème}}$ a été déposé sur ces cellules et la réaction de clarification poursuivie toute la nuit à +4°C et sous agitation. Le sérum a ensuite été récolté et utilisé dilué au $1/10^{\text{ème}}$ ($1/100^{\text{ème}}$ final) pour marquer la VP24. L'anticorps anti-Keap1 a été dilué au $1/400^{\text{ème}}$ et utilisé directement. Ainsi, la protéine VP24, exprimée seule, est répartie sous forme de petits agrégats péri-nucléaires, conformément à ce qui avait été montré précédemment [205] (**Figure R5A**). La protéine Keap1 surexprimée se localise de façon diffuse dans le cytoplasme (**Figure R5B**). Exprimées ensemble, ces deux protéines se relocalisent au sein de petits agrégats cytoplasmiques qui sont moins péri-nucléaires que ceux générés par la protéine VP24 seule. La protéine Keap1 est relocalisée en présence de la VP24 est perd sa diffusion régulière dans le cytoplasme (**Figure R5C**). La relocalisation de la protéine Keap1 en présence de VP24 de MARV suggère que son activité cellulaire pourrait être affectée.

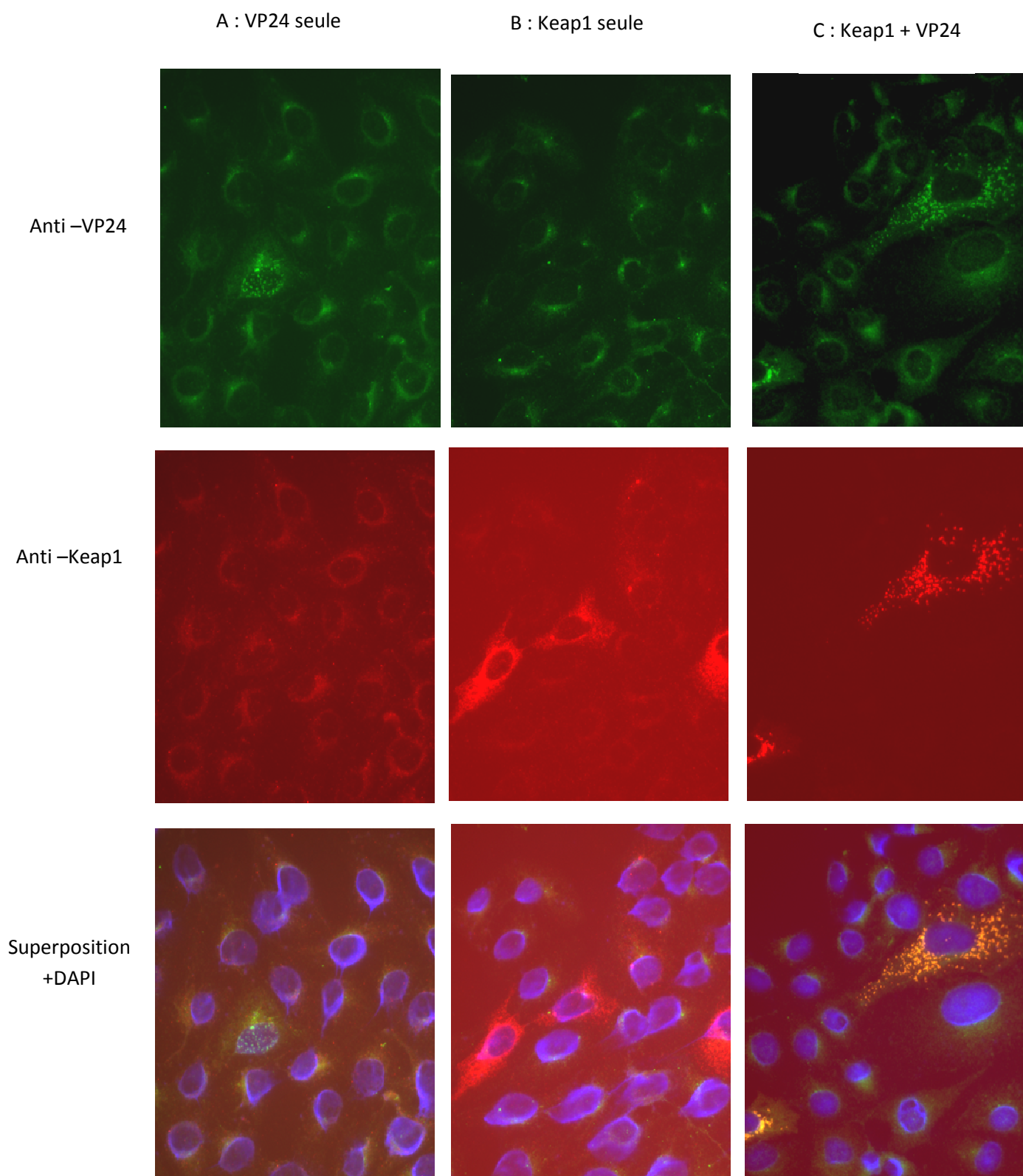


Figure R5: Les protéines VP24 et Keap1 colocalisent. Des cellules Vero ont été transfectées par le pHCMV-VP24 seul (A), par le pSPORT6-Keap1 seul (B) ou par les deux vecteurs (C). 16h après transfection, les cellules ont été fixées puis soumises à immunofluorescence indirecte contre les protéines Keap1 et VP24.

Identification des résidus de Keap1 impliqués dans son interaction avec VP24

Dans le but de mieux comprendre l'interaction Keap1-VP24, nous avons souhaité identifier le domaine de Keap1 qui permet sa liaison à la VP24. Les différents domaines de la protéine Keap1 sont connus : la première moitié de la protéine est constituée des domaines NTR, BTB et IVR, et la seconde moitié du domaine Kelch, lui-même composé par l'assemblage de 6 sous-domaines DGR et du domaine CTR (Voir Etude Bibliographique). D'après les informations obtenues dans le crible double hybride (Figure R2), le domaine Kelch était le plus sujet à l'interaction. Nous avons donc généré des mutants de délétion de Keap1 fusionnés à l'épitope myc à leur extrémité amino-terminale (**Figure R6A**). La capacité de ces mutants à lier la protéine VP24 a été testée par une expérience d'immunoprécipitation. Des cellules 293T ont été transfectées par les différents mutants de délétion de Keap1, seuls (puits 1 à 5) ou en présence du plasmide pHCMV-VP24-HA (puits 6 à 10). 24h après transfection, les cellules ont été lysées et soumises à une immunoprécipitation contre l'épitope HA. Les lysats cellulaires ainsi que les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot pour la présence de Keap1 et de VP24 MARV (**Figure R6B**). La protéine myc-Keap1 entière, ainsi que les mutants myc- Δ Nterm (délété de la première moitié de la protéine) et myc- Δ Cterm (délété du domaine CTR) sont capables de se lier à la VP24-HA. Par contre, le mutant myc- Δ Kelch (délété de la moitié carboxy-terminale de Keap1) perd totalement sa capacité à interagir avec VP24. Nos résultats montrent donc que le domaine Kelch est indispensable pour permettre à Keap1 de lier la VP24, alors que la délétion des autres domaines n'empêche pas l'interaction. La liaison de la VP24 à Keap1 est donc Kelch-dépendante, de même que la liaison de Nrf2 à Keap1 [336].

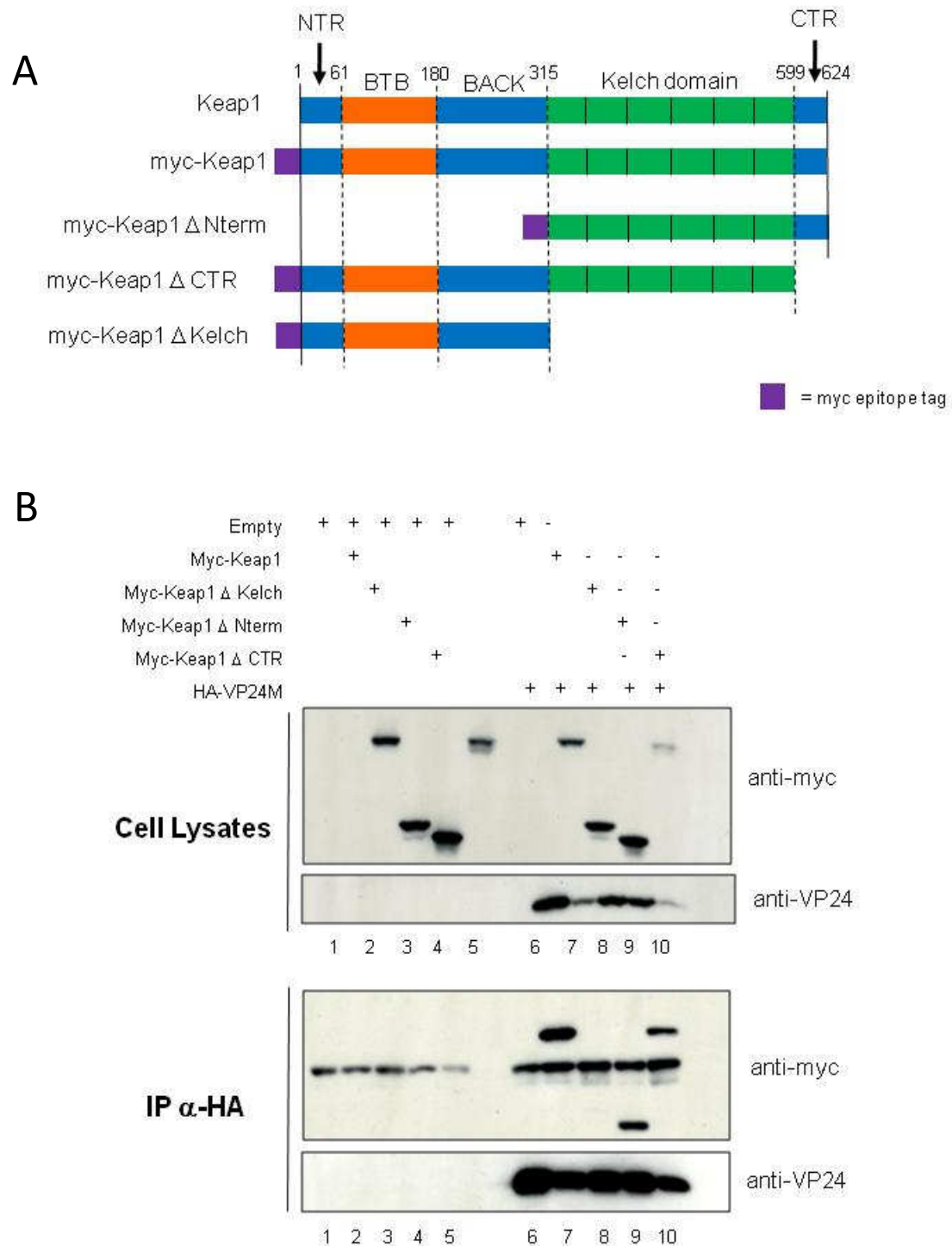


Figure R6. La protéine VP24 interagit avec le domaine Kelch de Keap1. (A) Représentation schématique des mutants de délétion générés, porteurs d'une étiquette myc à leur extrémité amino-terminale. (B) Test d'immunoprécipitation. Les mutants de délétion de Keap1 ont été exprimés seuls ou avec la protéine VP24-HA dans des cellules 293T. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et les lysats soumis à l'immunoprécipitation dirigée contre l'épitope HA. Les extraits cellulaires et les immunoprécipités ont été analysés par western blot avec un anticorps anti-VP24 et un anticorps anti-myc.

Dans la mesure où le domaine Kelch de Keap1 est impliqué dans sa liaison à Nrf2, nous avons alors souhaité savoir si au niveau moléculaire, les résidus de Keap1 impliqués dans l'interaction avec Nrf2 contrôlaient aussi l'interaction avec VP24. Nous avons donc généré une batterie de mutants de substitution qui perdaient leur capacité à lier Nrf2 [344, 345]. Les mutants Keap1 S383P, Y334A, R380A, N382A, R415A, fusionnés à l'épitope myc à leur extrémité amino-terminale ont été obtenus par mutagenèse dirigée. Afin de confirmer les données de la littérature et la fonctionnalité de notre système, ces mutants ont été testés pour leur capacité à lier Nrf2. Pour ce faire, ces mutants et le facteur Nrf2 ont été surexprimés dans des cellules 293T puis une immunoprécipitation dirigée contre l'épitope myc a été réalisée (**Figure R7A**). Dans tous les cas, la quantité de Nrf2 immunoprécipitée avec les mutants est plus faible que celle immunoprécipitée avec la protéine Keap1 sauvage, mais le mutant S383P semble être le plus affecté pour sa capacité à lier Nrf2.

La capacité de ces mutants de Keap1 à interagir avec la VP24 a alors été évaluée : ils ont été co-exprimés avec la protéine HA-VP24 dans des cellules 293T et une immunoprécipitation dirigée contre l'épitope HA a été réalisée. De façon intéressante, ces mutations semblent avoir les mêmes conséquences sur la liaison à la protéine VP24 (**Figure R7B**), c'est-à-dire que tous les mutants lient moins bien la VP24 que la protéine Keap1 sauvage, et en particulier, les mutants S383P et Y334A sont très affectés pour leur capacité à lier la VP24. Les résidus de Keap1 impliqués dans sa liaison à Nrf2 semblent donc aussi impliqués dans sa liaison à la VP24.

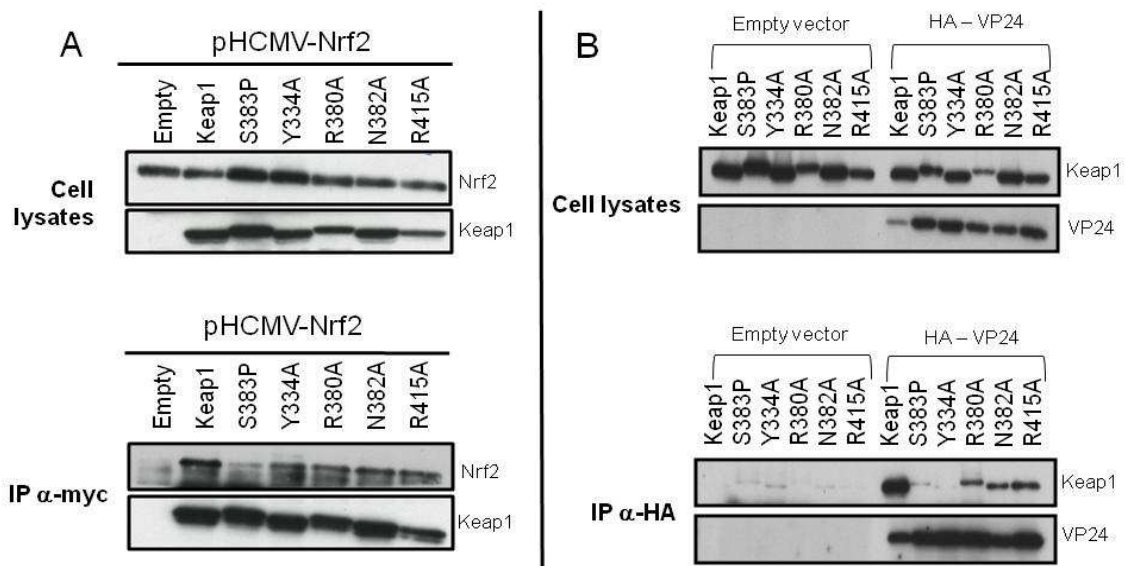


Figure R7. Les mutations ponctuelles du domaine Kelch qui empêchent la liaison de Keap1 à Nrf2 inhibent également sa liaison à VP24. (A) Test d'immunoprécipitation anti-myc. Des cellules 293T ont été transfectées par pHCMV-Nrf2 seul (empty) ou avec le pDEST-myc-Keap1 codant pour la protéine sauvage ou mutée ponctuellement comme indiqué. 24h après transfection, les cellules ont été lysées, puis l'immunoprécipitation réalisée contre l'épitope myc. La présence de chaque protéine dans les lysats (haut) et les immunoprécipités (bas) a été déterminée par western blot. (B) Test d'immunoprécipitation anti-HA. La protéine recombinante myc-Keap1, sauvage ou mutée, a été exprimée seule ou avec la protéine VP24-HA dans des cellules 293T. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et l'immunoprécipitation anti-HA a été réalisée. La présence de chacune des protéines dans le lysat cellulaire (haut) et l'immunoprécipité (bas) a été déterminée par western blot.

Etude des conséquences de l'interaction Keap1-VP24 sur l'activité de Keap1

Dans les conditions normales, Keap1 inhibe l'activité du facteur de transcription Nrf2. Afin de mesurer les conséquences de l'interaction VP24-Keap1 sur le rôle inhibiteur de Keap1, nous avons analysé l'activité de Nrf2 exprimé seul, en présence de Keap1 et de différentes concentrations de la VP24 de MARV.

Dans un premier temps, nous avons réalisé un test de liaison de Nrf2 à sa séquence d'ADN cible, le promoteur ARE, en utilisant le kit TransAM DNA binding assay (Active Motif®). Ce kit permet de réaliser un fractionnement nucléo-cytoplasmique des cellules. La fraction nucléaire est ensuite chargée dans un puits dont le fond est tapissé de séquences promotrices ARE. L'accrochage de Nrf2 à ces séquences est mesuré par ajout d'un anticorps primaire, suivi de l'addition d'un anticorps secondaire couplé à la HRP. La réaction est révélée par dosage colorimétrique de l'activité de la HRP (voir **Figure R8**).

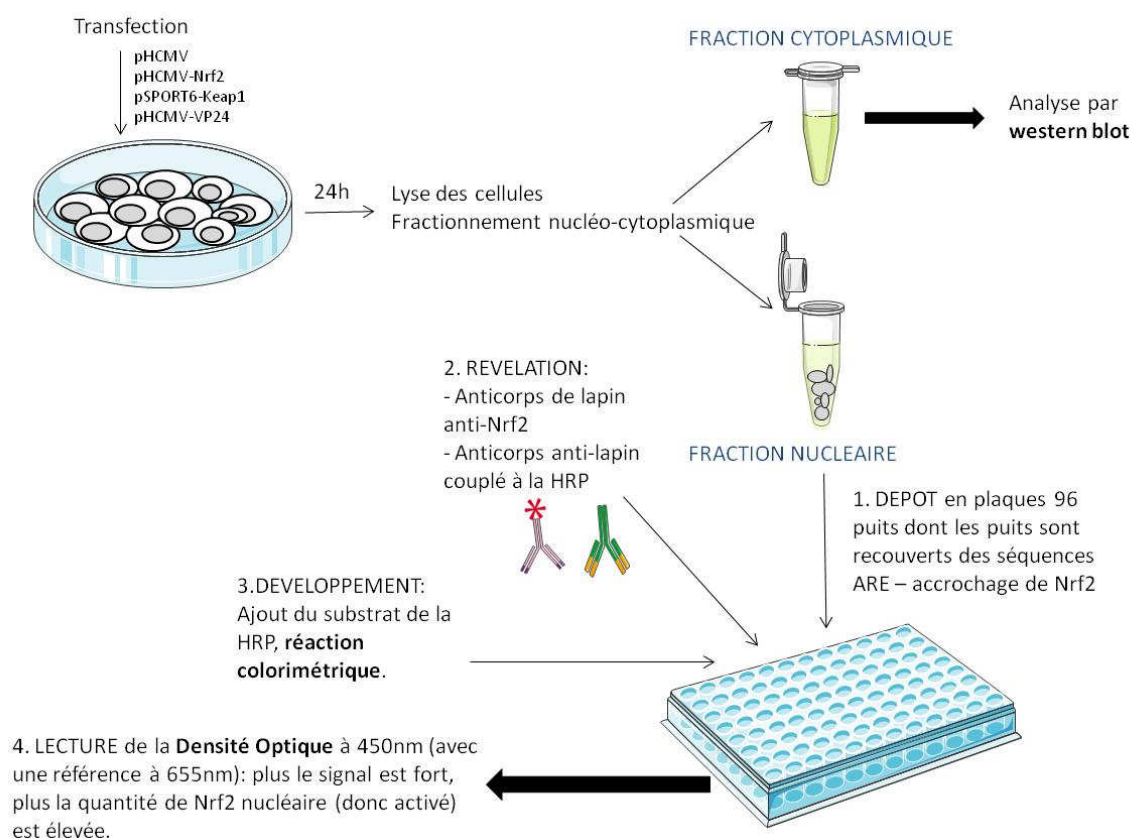


Figure R8 : Principe du test TransAM.

Des cellules 293T ont été transfectées par le plasmide Nrf2, seul ou avec Keap1, et nous avons ajouté des concentrations croissantes de VP24. 24h après transfection, les cellules ont été lysées, et les fractions nucléo-cytoplasmiques ont été séparées. Les fractions cytoplasmiques ont ensuite été analysées par western blot pour contrôler la présence des protéines surexprimées (**Figure R9A**). De façon intéressante, la quantité de Nrf2 présente dans la fraction cytoplasmique de nos essais diminue non seulement en présence de Keap1 (en raison de sa capacité à induire la dégradation

protéasomique de Nrf2), mais également en présence de la VP24. Les fractions nucléaires ont ensuite été analysées pour la capacité de Nrf2 à se lier au promoteur ARE (**Figure R9B**). Les résultats obtenus ici corroborent les résultats d'analyse de la fraction cytoplasmique : la capacité de Nrf2 à lier la séquence ARE est fortement diminuée en présence de Keap1, mais l'addition de concentrations croissantes de VP24 empêche cette inhibition Keap1-dépendante, et conduit finalement à une restauration de l'activité de Nrf2.

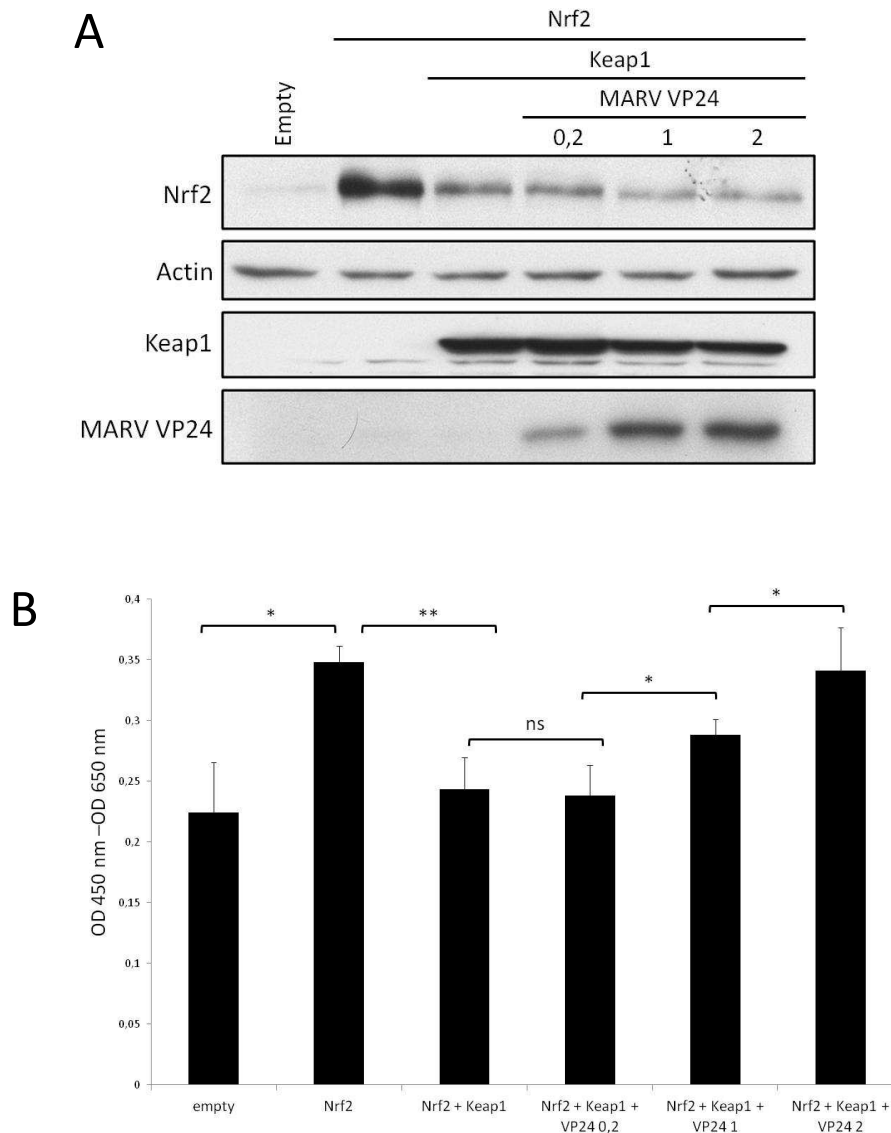


Figure R9. La VP24 induit la liaison de Nrf2 aux séquences ARE. Des 293T ont été transfectées comme indiqué, la quantité totale d'ADN égalisée dans chaque condition par l'ajout de pHCMV vide. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et les extraits nucléaires et cytoplasmiques séparés, grâce au kit TransAm. (A) détection de Keap1, VP24, Nrf2 et Actine dans les fractions cytoplasmiques par western blot. (B) test de liaison de Nrf2 à l'ADN: les fractions nucléaires ont été analysées pour la capacité de Nrf2 à se lier aux séquences promotrices qu'il cible, en suivant les recommandations du fournisseur. Les données correspondent à la densité optique à 450nm – la densité optique à 655nm. Le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur sont les écarts-type. Un test de Student a ensuite été réalisé comme indiqué par les crochets. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ns : non significatif.

Ce résultat suggère donc que la protéine VP24 de MARV pourrait lever l'inhibition de Nrf2 dont Keap1 est responsable. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé un système de gène rapporteur pour mesurer l'activité de Nrf2. Le plasmide pHHO1-Luc, codant pour la Firefly-Luciférase dont l'expression est sous le contrôle du promoteur ARE du gène HO-1 a été employé. Dans ce système, l'expression de la Firefly luciférase est strictement dépendante de l'activité de Nrf2 (voir **Figure R10**).

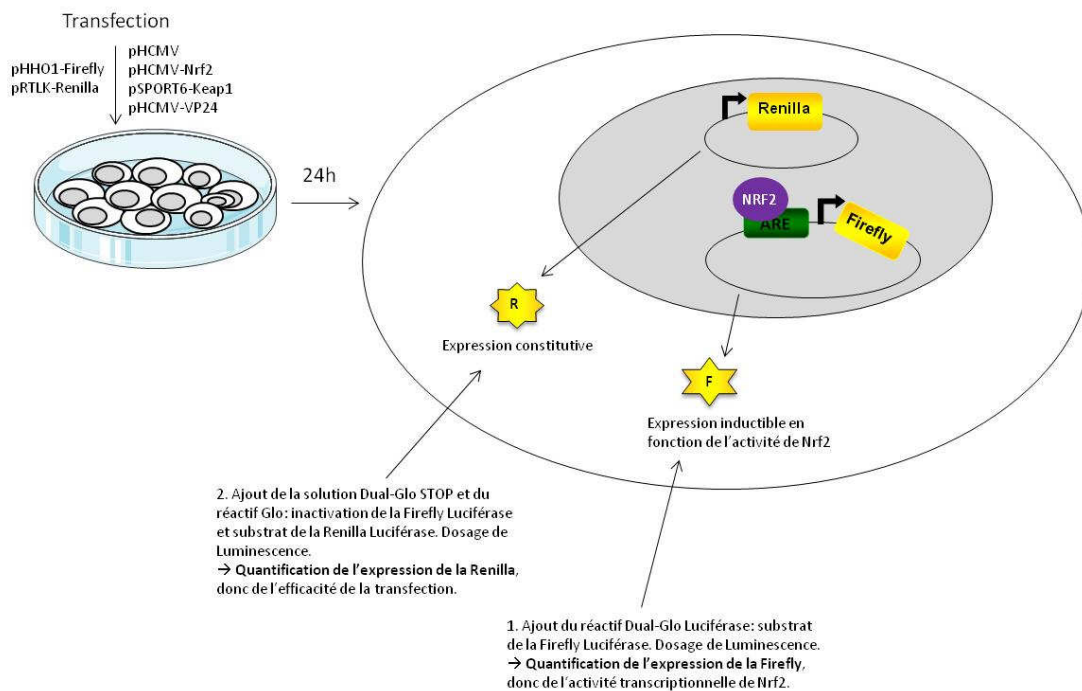


Figure R10 : Principe de la mesure de l'activité du gène rapporteur exprimé par le pHHO1-Firely Luc.

Le pHHO1-Luc a été utilisé en combinaison avec le pRTLK, qui code pour la Renilla-Luciférase, dont l'expression est constitutive, et qui marque l'efficacité de transfection pour chaque condition. Des cellules 293T ont été transfectées avec ces deux vecteurs et avec les plasmides pHCMV, pHCMV-Nrf2, pSPORT6-Keap1, pHCMV-VP24, comme indiqué sur la **Figure R11**. 24h après transfection, Les valeurs de Firefly et de Renilla Luciferase ont été mesurées indépendamment grâce au kit Dual Glo Luciferase Assay System (Promega®). L'activité de la Firefly Luciferase (inductible) a été mesurée et normalisée par la valeur de la Renilla Luciferase (constitutive), en utilisant la formule :

Valeur normalisée= (Valeur de Firefly-Luciférase)/(Valeur de Renilla-Luciférase).

La valeur d'induction a ensuite été évaluée par comparaison avec le contrôle négatif (transfection avec le pHCMV vide, empty):

Induction (fold)= (Valeur normalisée de l'essai)/(Valeur normalisée du contrôle négatif)

Les résultats obtenus sont présentés **Figure R11**. Par comparaison au contrôle négatif (empty), l'expression de Nrf2 induit une augmentation de l'activité de la Firefly Luciferase (fold de 7,8), alors

que l'addition de Keap1 induit un retour à un niveau de base (fold inférieur à 2). Dans ces conditions, l'addition de concentrations croissantes de VP24 restaure partiellement l'activité de Nrf2 (jusqu'à un fold de 4,3), ce qui indique que la VP24 pourrait restaurer l'activité transcriptionnelle de Nrf2 qui était inhibée par Keap1.

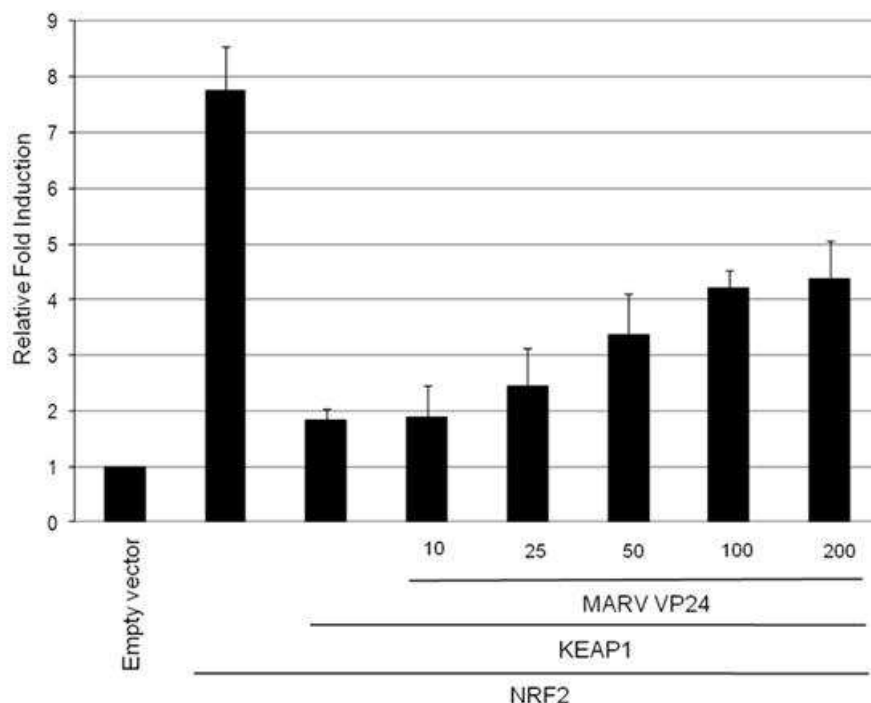


Figure R11. La VP24 induit l'activité du facteur de transcription Nrf2. Des 293T ont été transfectées avec les plasmides indiqués ainsi qu'avec le pHHO1-Luc et le pRTKL. Le jour suivant, les cellules ont été lysées et l'activité de la Firefly et de la Renilla Luciférase ont été mesurées. La valeur de Firefly a été normalisée par la valeur de Renilla, et ces valeurs ont ensuite été comparées à la valeur obtenue dans les cellules transfectées avec un plasmide vide (Fold : 1). Ce graphique représente les valeurs moyennes obtenues au cours de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur reflètent l'écart-type. Les nombres indiquent la quantité de VP24 transfectée, en ng.

Les deux expériences réalisées ici indiquent que la protéine VP24 de MARV restaure la capacité de Nrf2 à se lier à ses séquences d'ADN cible et que le facteur Nrf2, ainsi activé, est capable d'induire l'expression d'un gène rapporteur ARE.

L'expression de la VP24 active la voie de signalisation médiée par Nrf2, en transfection et en infection.

Afin de confirmer la capacité de la protéine VP24 à activer le facteur Nrf2, nous avons évalué la production d'une protéine cible de Nrf2, NQO1, par western blot. Des cellules 293T ont été infectées par MARV, à une forte dose : Multiplicité d'Infection (MOI) de 5 ou 10. Un contrôle a été réalisé en employant le même virus préalablement inactivé par les UV (et donc non répliquatif). En parallèle, la même expérience a été réalisée avec des cellules transfectées par 2 concentrations différentes de pHCMV-VP24, ou du pHCMV vide comme contrôle. 1, 2 et 3 jours après l'infection (**Figure R12A**) ou la transfection (**Figure R12B**), les cellules ont été lysées et les lysats analysés par western blot pour la présence de VP24 et de NQO1. La quantité de cellules a été évaluée par la mesure de l'actine. L'expression de NQO1 augmente au cours du temps dans les cellules infectées, et ceci de façon dose-dépendante. De même, dans les cellules transfectées, la présence de VP24 conduit à l'expression de NQO1, également de façon dose-dépendante. La protéine NQO1 était également détectable à un

niveau plus faible dans les cellules transfectées par le pHCMV vide. Nous présumons que cette petite induction apparaîtrait en conséquence de la forte confluence des cellules.

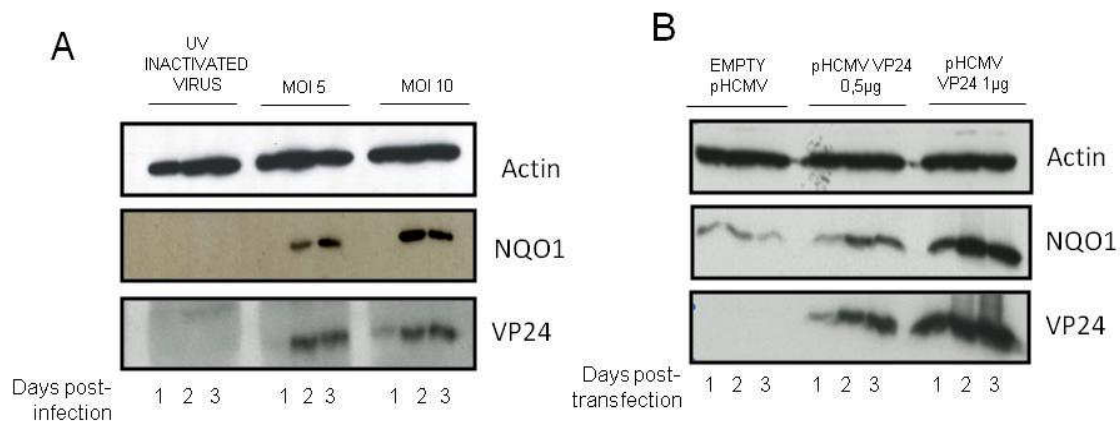


Figure R12: La VP24 induit l'expression des gènes cibles de Nrf2. Des 293T ont été (A) infectées par MARV à une Multiplicité d'Infection (MOI) de 10 de virus préalablement inactivé aux UV, ou par du virus vivant à la MOI indiquée (5 ou 10) ou (B) transfectées avec 2 concentrations de pHCMV-VP24 ou du pHCMV vide. 1, 2 et 3 jours après la transfection/l'infection, les cellules ont été lysées et analysées par western blot pour la VP24, NQO1 et l'actine.

La surexpression de protéines exogènes causée par l'infection ou la transfection sont des événements cellulaires stressants qui peuvent conduire à un stress du réticulum endoplasmique et par conséquent à l'activation de Nrf2 [413]. Aussi, pour confirmer que l'activation observée précédemment était bien liée à la protéine VP24, nous avons analysé l'induction de l'expression de NQO1 en transfectant une autre protéine virale, la VP30 d'EBOV (**Figure R13**). Des cellules 293T ont été transfectées par 1 µg de pHCMV vide, de pHCMV VP24 MARV ou de pHCMV VP30 EBOV. Les cellules ont été lysées 1, 2 et 3 jours après la transfection et les lysats ont été analysés de la même façon que précédemment par western blot pour l'expression de NQO1, de l'actine et des protéines virales.

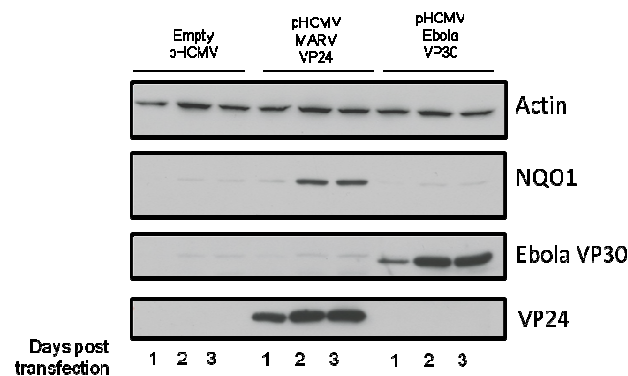


Figure R13. L'induction de NQO1 est dépendante de la VP24. Des 293T ont été transfectées avec 1 µg des plasmides indiqués. Les cellules ont été lysées aux temps indiqués après la transfection, et les lysats ont été analysés par western blot pour la présence de VP24 de MARV, de VP30 d'EBOV, de NQO1 et d'Actine.

Comme précédemment, la transfection avec un plasmide vide ne conduit pas à l'expression de NQO1, alors que l'ajout de la VP24 de MARV permet d'exprimer NQO1. Par contre, la VP30 d'EBOV n'a aucun effet sur l'expression de NQO1. Ce résultat permet d'infirmer l'hypothèse de l'activation de Nrf2 suite à un stress causé par l'expression d'une protéine exogène, et témoigne donc de la spécificité d'action de la VP24 en regard de l'activation de Nrf2.

2EME PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS DE MARBURG ACTIVE LE FACTEUR NUCLEAIRE ERR α .

Dans la première partie de ce travail, nous avons découvert que la protéine VP24 de MARV inhibait la régulation de Keap1 sur le facteur cellulaire Nrf2. Keap1 agit comme un adaptateur pour CUL3, une E3-ubiquitine ligase qui permet l'accrochage des chaînes d'ubiquitine au substrat qui doit être dégradé. Le ciblage de Keap1 par la VP24 induit l'activation de Nrf2, en d'autres termes la VP24 inactive Keap1 pour son activité inhibitrice de Nrf2. Nous nous sommes alors interrogés sur le devenir d'autres protéines cellulaires dont l'activité est modulée par Keap1, et en particulier sur les facteurs de transcription, afin d'évaluer le rôle de la VP24 dans la modulation du métabolisme cellulaire.

Alors que nous identifions l'interaction entre Keap1 et VP24, une équipe voisine de la nôtre, dirigée par Jean Marc Vanacker (IGFL de Lyon) démontrait que Keap1 était un inhibiteur d'un autre facteur de transcription cellulaire, le facteur ERR α (*Estrogen Receptor-related Receptor alpha*). Ce récepteur nucléaire orphelin appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones et est impliqué dans la survie cellulaire [414], la division cellulaire [415]. En outre, une forte expression de ce facteur est considérée comme mauvais pronostic dans le développement de cancers et dans l'expansion tumorale [416]. Enfin, il semblerait que le facteur ERR α joue également un rôle important dans la migration cellulaire.

Au point de vue moléculaire, la surexpression de Keap1 conduit à la diminution de l'activité d'ERR α dans un système de gène rapporteur. De plus, un autre adaptateur des substrats cellulaires à CUL3, la protéine SPOP (*BTB Domain-containing Speckle-type POZ Protein*) [417] a également été incriminé dans l'inhibition de l'activité de ERR α . En raison de leur capacité à lier CUL3, Keap1 et SPOP pourraient être à l'origine de l'ubiquitination d'ERR α et de son adressage au protéasome. Par contre, une autre protéine se liant à CUL-3, la protéine KLHL12, n'inactive pas ERR α , qui reste actif au niveau transcriptionnel (voir **Figure R14**). Dans ce contexte, il était particulièrement intéressant pour nous d'étudier l'impact de la VP24 de MARV sur l'activité de ERR α .

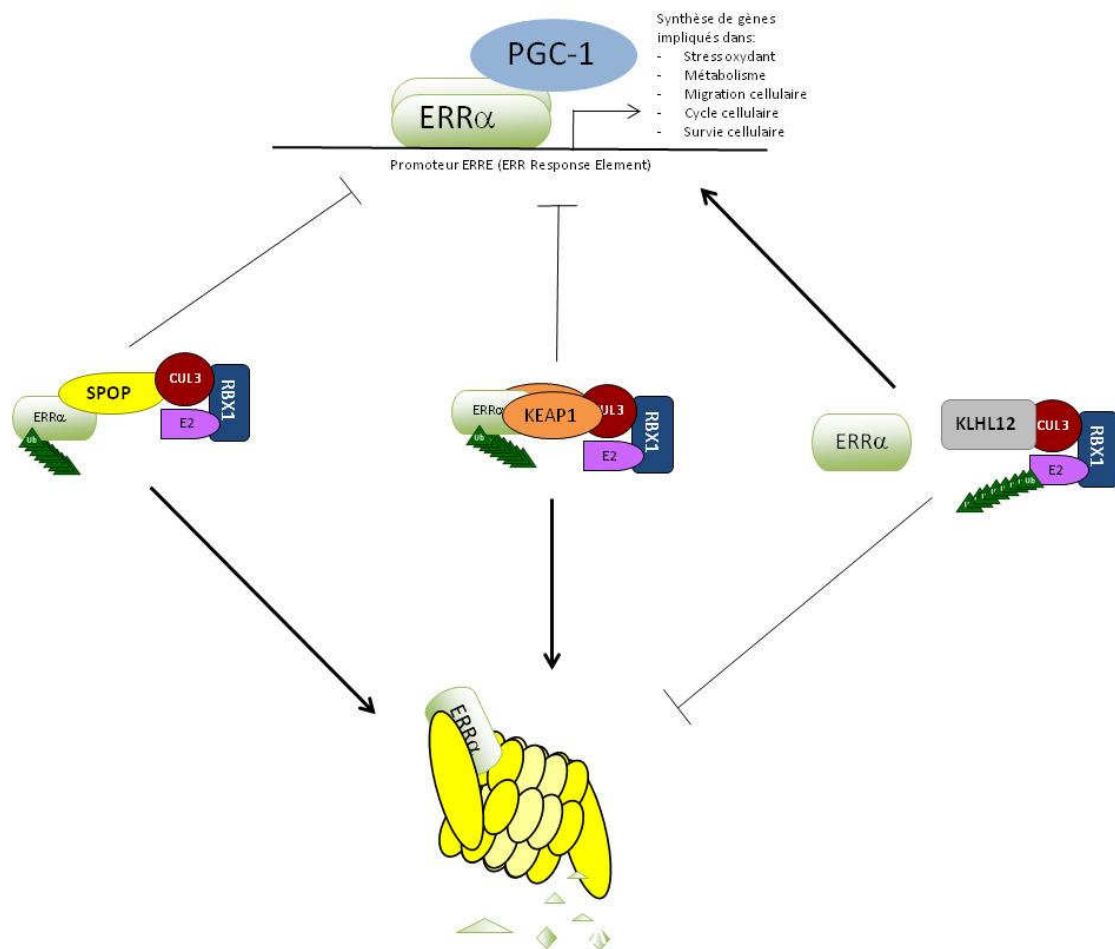


Figure R14 : Implication des adaptateurs de CUL-3 dans la régulation de l'activité du facteur de transcription ERRα. En présence de Keap1 ou de SPOP, l'activité transcriptionnelle d'ERRα est inhibée. En raison des caractéristiques connues de ces protéines (adaptateurs pour l'ubiquitination et pour l'adressage au protéasome), nous supposons qu'ERRα serait envoyé vers le protéasome en présence de ces protéines. Par contre, un autre adaptateur de CUL3, KLHL12, n'inhibe pas ERRα, et n'induirait donc pas son adressage au protéasome.

Nous avons tout d'abord quantifié l'activité de ERRα exprimé seul ou en combinaison avec différentes protéines cellulaires. Pour ce faire, nous avons utilisé un système de gène rapporteur Luciférase codé par le plasmide pGL3-ErrEtk-Luciférase. De façon similaire au système employé précédemment pour quantifier l'activité transcriptionnelle de Nrf2 (Figure R10), ce plasmide permet d'évaluer l'activité de ERRα, puisque l'expression de la Firefly-Luciférase est sous le contrôle de la séquence cible promotrice où se fixe ERRα (voir **Figure R14**). Ce système de gène rapporteur a été employé pour toutes les expériences réalisées de cette partie de notre travail.

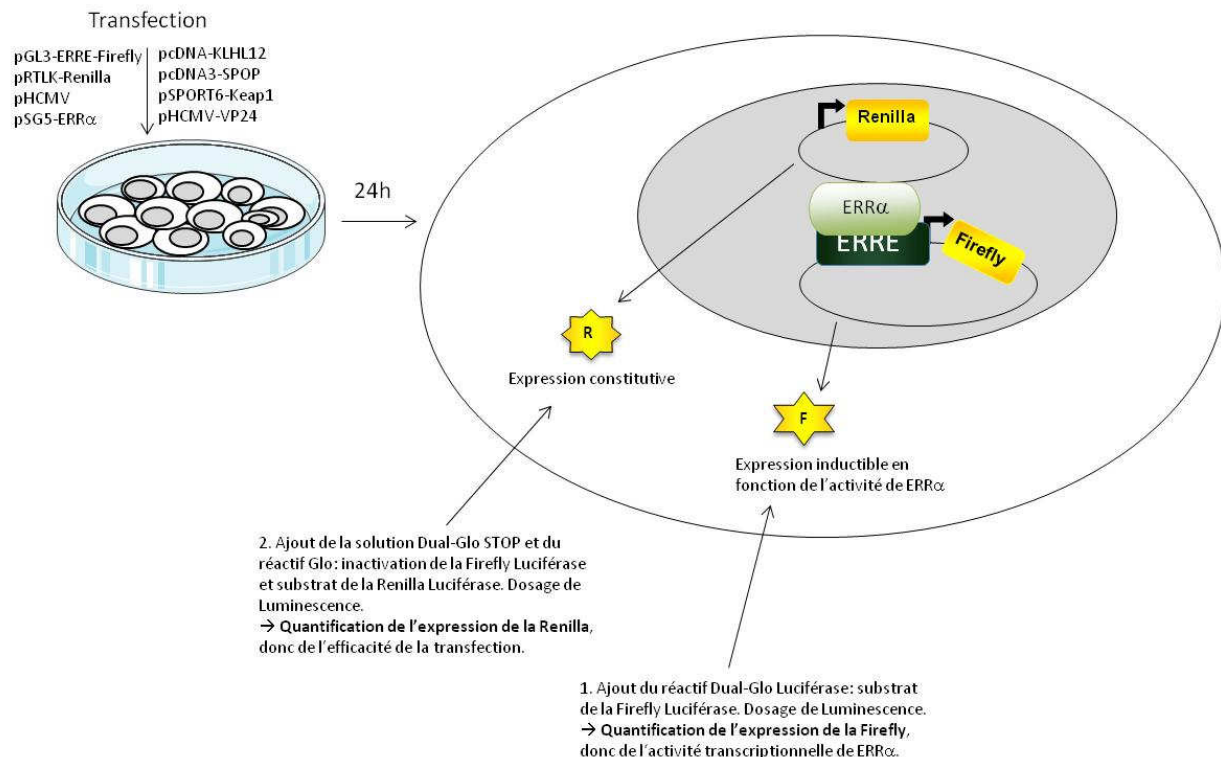


Figure R14 : Principe de la mesure de l'activité du gène rapporteur exprimé par le pGL3-ERRE-TkLuc (Firefly), sous le contrôle du facteur de transcription ERR α .

Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer l'activité de différentes protéines partenaires de CUL3 sur l'activité d'ERR α . Pour ce faire, des cellules Hela ont été transfectées par le plasmide pGL3-ErrEtk-Luciférase, le plasmide pRTLK, en présence d'ERR α -Flag (barres noires) ou de plasmide vide (barres blanches). Les protéines testées pour la modulation d'ERR α ont également été surexprimées, par transfection des plasmides pSPORT6-Keap1, pcDNA3-SPOP-HA ou pcDNA-KLHL12. 48h après transfection, les activités Firefly et Renilla Luciférase ont été déterminées, et la valeur de Firefly normalisée par la valeur Renilla (reflet du nombre de cellules transfectées). Ces valeurs ont ensuite été comparées à la valeur contrôle (sans expression d'ERR α ni de protéine modulatrice, fold :1). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure R15**. La surexpression d'ERR α active fortement l'activité du gène rapporteur, permettant d'atteindre un Fold de 8. SPOP et Keap1 diminuent l'activité d'ERR α , en conduisant à des Folds de 3 et 6,5, respectivement. L'inhibition Keap1-dépendante apparaît donc plus modérée que l'inhibition SPOP-dépendante. Par contre, l'expression de KLHL12 (*Kelch-Like Protein 12*), un autre adaptateur de CUL3 [418], n'induit pas d'inhibition de ERR α , et semble même activer le facteur, puisqu'on atteint un Fold de 14,5 (possiblement en induisant une saturation des E3 Ubiquitine Ligases). Ce résultat montre que le ciblage de ERR α par des adaptateurs de CUL3 est fortement spécifique de l'adaptateur employé, et confirme les résultats préalablement obtenus par nos collaborateurs.

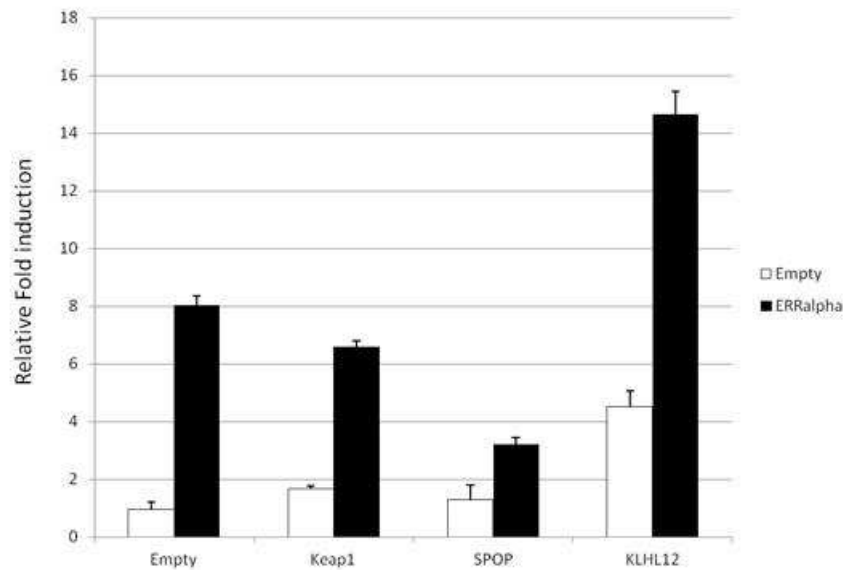


Figure R15: Keap1 inhibe l'activité transcriptionnelle de ERR α . Des cellules Hela ont été transfectées par pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pHCMV vide (barres blanches) ou pSG5-ERR α -Flag (barres noires) et par les plasmides codants pour les protéines indiquées (pSPORT6-Keap1, pcDNA3-SPOP-HA, pcDNA-KLHL12). 48h après transfection, les valeurs de Firefly (inducible) et de Renilla (constitutive) ont été mesurées. Les valeurs de Firefly Luciférase ont été normalisées par la valeur de Renilla puis comparées à la valeur du contrôle négatif non stimulé (transfection avec le plasmide vide). Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Dans ce contexte, nous avons alors voulu savoir si la VP24 exerçait une régulation sur l'activité transcriptionnelle d'ERR α . Pour ce faire, nous avons réalisé la même expérience que précédemment, en utilisant les mêmes plasmides (pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pSG5-ERR α -Flag), et des concentrations croissantes de pHCMV-VP24. Nous constatons que plus la quantité de VP24 est élevée, plus l'activité de ERR α augmente. Donc, il semble que la VP24 soit capable d'induire l'activité transcriptionnelle de ERR α , et ceci de façon dose-dépendante (**Figure R16**).

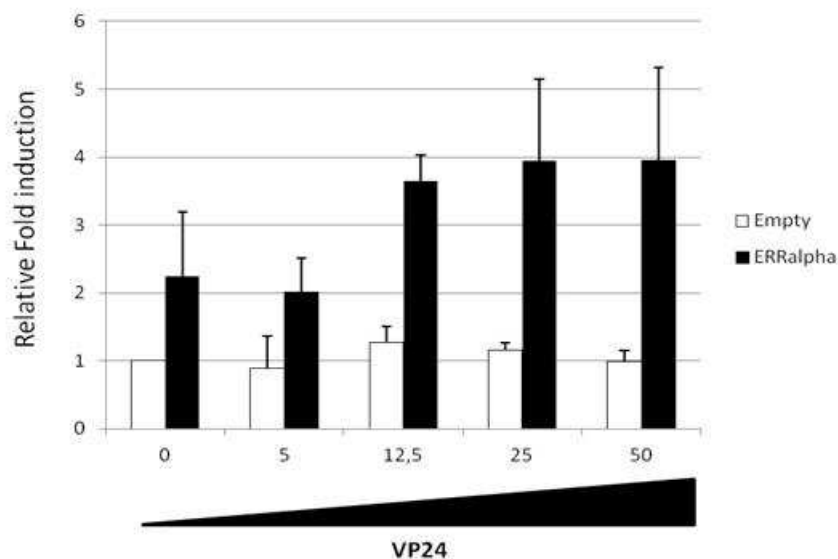


Figure R16: La protéine VP24 active le facteur ERR α . Des cellules Hela ont été transfectées par pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pHCMV vide (barres blanches) ou pSG5-ERR α -Flag (barres noires) et des concentrations croissantes de pHCMV-VP24. 48h après transfection, les valeurs de Firefly (inducible) et de Renilla (constitutive) ont été mesurées. Les données de Firefly Luciférase ont été normalisées par la valeur de Renilla puis les données ont été comparées à la valeur du contrôle négatif non stimulé (transfection avec le plasmide vide). Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Dans la mesure où la VP24 cible Keap1 et où Keap1 inhibe $ERR\alpha$, nous avons supposé que l'activation d' $ERR\alpha$ en présence de VP24 était liée à Keap1. Afin de confirmer cette hypothèse, l'activité du gène rapporteur codé par le plasmide pGL3-ErrEtk-Luciférase a été mesurée en employant la stratégie expérimentale décrite précédemment. Ici, des cellules Hela ont été transfectées avec la combinaison pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, en présence d' $ERR\alpha$ -Flag (barres noires) ou non (barres blanches) en présence de 2 concentrations différentes du plasmide pSPORT6-Keap1 (12,5 ou 25 ng par puit), ou de SPOP, à une concentration de 25ng par puit. Des quantités croissantes de VP24 de MARV ont également été transfectées. 48h après transfection, les mesures de Firefly et de Renilla Luciférase ont été mesurées et analysées comme précédemment pour calculer l'induction de l'expression du gène rapporteur (**Figure R17**).

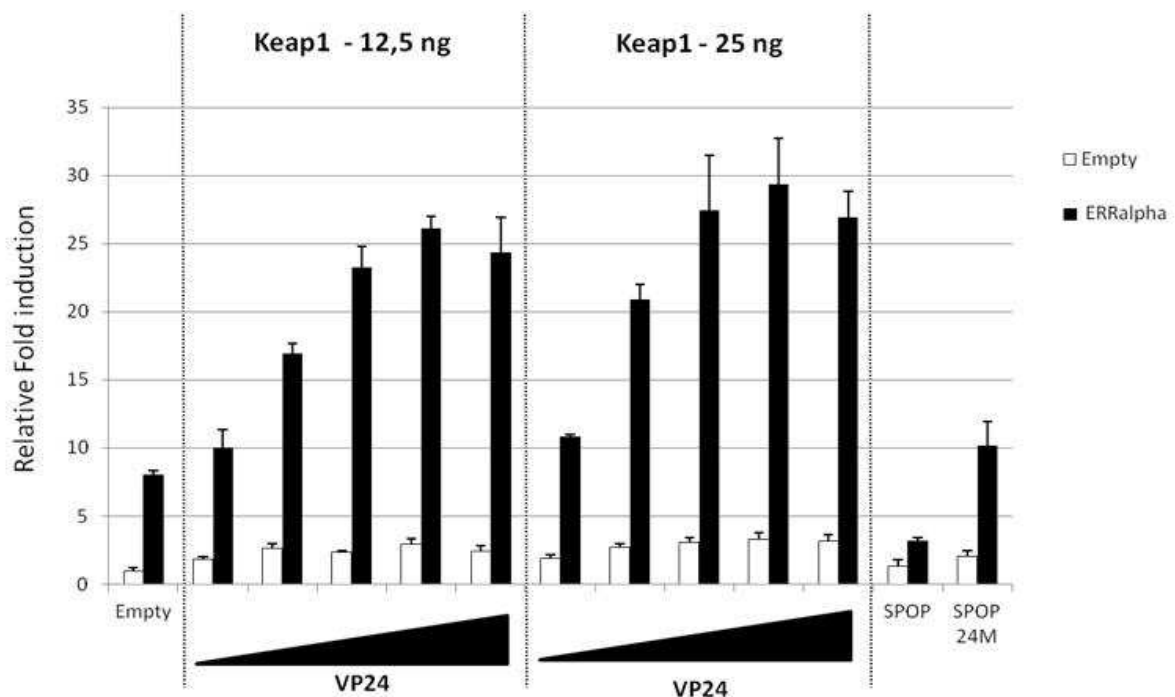


Figure R17: L'action de la VP24 sur $ERR\alpha$ ne change pas en fonction de la dose de Keap1 employée. Des cellules Hela ont été transfectées par pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pHCMV vide (barres blanches) ou pSG5- $ERR\alpha$ -Flag (barres noires) et des concentrations croissantes de pHCMV-VP24 (0, 5, 12.5, 25 et 50 ng) combinées deux concentrations différentes de pSPORT6-Keap1 (12,5 ou 25 ng), ou avec 25 ng de pcDNA3-SPOP-HA. 48h après transfection, les valeurs de Firefly (inducible) et de Renilla (constitutive) ont été mesurées. Les valeurs de Firefly Luciférase ont été normalisées par la valeur de Renilla puis les données ont été comparées à la valeur du contrôle négatif non stimulé (transfection avec le plasmide vide). Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

De façon surprenante, l'augmentation d'activité de $ERR\alpha$ par addition de VP24 était identique quelque soit la quantité de Keap1 présente. De plus, nous avons également testé l'effet de la VP24 sur l'activité d' $ERR\alpha$ en présence d'un autre inhibiteur, SPOP. De même que pour Keap1, la VP24 semble capable de supprimer l'effet inhibiteur de SPOP en restaurant l'activité d' $ERR\alpha$, mais cet effet est plus modéré que celui observé lorsque Keap1 est surexprimé (**Figure R17**).

Enfin, nous avons testé l'effet de la VP24 en présence de différentes molécules, inhibitrices de $ERR\alpha$ (**Figure R18**) : Keap1, SPOP, CUL3 ; ou non-inhibitrice : KLHL12. Des cellules Hela ont été transfectées avec les mêmes plasmides que précédemment : pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pSG5- $ERR\alpha$ -Flag, en présence de pHCMV-VP24 (barres noires) ou de plasmide vide (barres blanches), et

des plasmides codants pour des adaptateurs de CUL3 : Keap1, SPOP, KLHL12, ou de CUL3 elle-même. L'activité du gène rapporteur a été normalisée par l'activité de la Firefly-luciférase. Les valeurs ont été comparées à la valeur obtenue dans le contrôle (surexpression d'ERR α sans autre protéine).

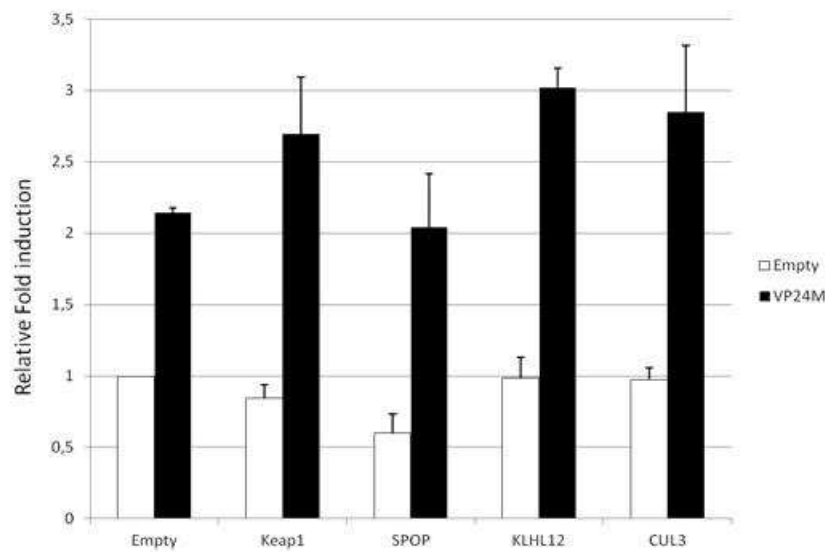


Figure R18: la VP24 de MARV restaure l'activité d'ERR α indépendamment de la protéine inhibitrice employée. Des cellules Hela ont été transfectées par pGL3-ErrEtk-Luciférase, pRTKL, pSG5-ERR α -Flag en présence de pHCMV-VP24 (barres noires) ou de pHCMV vide (barres blanches), et des inhibiteurs indiqués (pSPORT6-Keap1, pcDNA3-SPOP-HA, pcDNA-KLHL12, pHCMV-CUL3). 48h après transfection, les valeurs de Firefly (inducible) et de Renilla (constitutive) ont été mesurées. Les données de Firefly Luciférase ont été normalisées par la valeur de Renilla puis les données ont été comparées à la valeur du contrôle négatif non stimulé (transfection avec le plasmide vide en absence d'inhibiteur). Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Alors qu'en absence de VP24, les protéines Keap1 et SPOP inhibent ERR α , la protéine KLHL12, et de façon surprenante la protéine CUL3, ne bloquent pas cette activité (barres blanches). Par contre, l'expression de la VP24 (barres noires) induit une plus grande activation d'ERR α , et ce, même en absence d'inhibiteur (pHCMV vide ou KLHL12).

3EME PARTIE : LA PROTEINE VP24 DU VIRUS EBOLA EST UN INHIBITEUR DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2

La protéine VP24 d' EBOV possède 36% d'homologie de séquence avec la protéine VP24 de MARV, et ces protéines sont parmi les plus conservées dans la famille des *Filoviridae*. En outre, elles possèdent des propriétés communes, telle que leur capacité à s'oligomériser et à s'associer aux membranes. Enfin, elles sont toutes les deux impliquées dans la condensation des nucléocapsides virales. Compte tenu de l'existence de fonctions communes pour ces protéines, il nous a donc semblé intéressant d'évaluer la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire en présence de la VP24 d'EBOV, la première partie de ce travail ayant mis en évidence que Keap1 interagit avec la VP24 de MARV, résultant en une activation du facteur de transcription Nrf2.

La protéine VP24 du virus Ebola inhibe l'activité de Nrf2

Nous avons tout d'abord tenté de voir si lors de l'infection par EBOV il existait une régulation de l'activité de Nrf2. Des cellules 293T ont été transfectées soit par un plasmide vide (empty), soit par le pHMCV-Nrf2, avant d'être infectées 3h plus tard par le virus EBOV recombinant (produit par génétique inverse) à une MOI de 3, ou laissées non-infectées. 1, 2 et 3 jours après infection, les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli et les lysats analysés par western blot pour l'expression de NQO1, VP24, Nrf2 et de l'Actine. Le signal obtenu pour le western blot anti-NQO1 a été quantifié à l'aide du Chemidoc XRS Imager (Biorad) puis normalisé par le signal obtenu pour l'actine sur la même membrane, et comparé à la valeur obtenue pour le contrôle négatif (puits non infecté, non transfecté à jour 1). Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression du facteur Nrf2 conduit à son activation, c'est pourquoi la quantité relative de NQO1 était augmentée (**Figure R19A**, comparer le graphe de gauche avec celui de droite). Ce système était donc judicieux pour évaluer l'effet d'EBOV sur l'activité de Nrf2. Dans tous les cas, l'expression de NQO1 était augmentée au cours du temps, mais dans les cellules infectées et transfectées par le plasmide vide, le taux d'NQO1 relatif était plus faible que dans les cellules non-infectées (**Figure R19A**, panel de gauche). Cet effet, bien que plus modéré, était toujours visible dans les cellules préalablement transfectées par Nrf2. Dans les deux cas, l'inhibition de la synthèse de NQO1 semble plus marquée le 3^{ème} jour que le 2^{ème} jour post-infection. La différence d'effet du virus EBOV entre les deux types de cellules (transfectées par Nrf2 ou par le plasmide vide) s'explique probablement par le fait que la surexpression de Nrf2 est très puissante en termes d'activation de sa fonction transcriptionnelle, et en parallèle le blocage de cette activité par EBOV nécessite plus de temps pour permettre la synthèse des protéines virales impliquées dans cette inhibition.

Dans le but de confirmer l'effet inhibiteur d'EBOV sur le facteur Nrf2, nous avons développé une deuxième approche expérimentale, où des cellules Vero ont été infectées à une MOI de 3 pendant 24h avant d'être traitées par 10µM de tBHQ. tBHQ est une molécule libérant Nrf2 de Keap1 et favorisant sa stabilisation, ce qui conduit à son activation [419]. Les cellules ont été lysées 1, 2 et 3 jours après l'infection, et les lysats ont été analysés de même que précédemment. L'effet de tBHQ, s'il existe, était difficilement perceptible dans notre test, soit parce qu'une concentration trop faible a été utilisée, soit parce que l'activité de cette molécule n'est pas stable au cours du temps. Toutefois, l'effet d'EBOV sur la synthèse de NQO1 était visible, que les cellules soient traitées ou non. En effet, alors qu'il est difficile d'observer une différence d'induction de NQO1 entre les cellules infectées et non-infectées à jour 1 (**Figure R19B**, panel de gauche), à partir du 2^{ème} jour d'infection le

taux relatif d'expression de NQO1 était clairement diminué dans les cellules infectées par rapport aux cellules non-infectées, ce qui confirme notre analyse précédente en 293T qui montrait une inhibition de l'activité de Nrf2 par EBOV, et ceci de façon dépendante du temps. De plus, de façon intéressante, l'inhibition EBOV-dépendante de la synthèse de NQO1 semble plus forte dans les cellules traitées avec tBHQ que dans les cellules non traitées (**Figure R19B**, comparer le panel « ZEBOV » de gauche infecté avec le panel « ZEBOV » de droite).

Ces deux expériences montrent donc que contrairement à ce que nous avons mis en évidence lors d'une infection à MARV, l'infection de cellules par EBOV conduit à un blocage de l'expression de protéines sous le contrôle du facteur de transcription Nrf2. Le virus EBOV empêche donc l'activité transcriptionnelle de Nrf2.

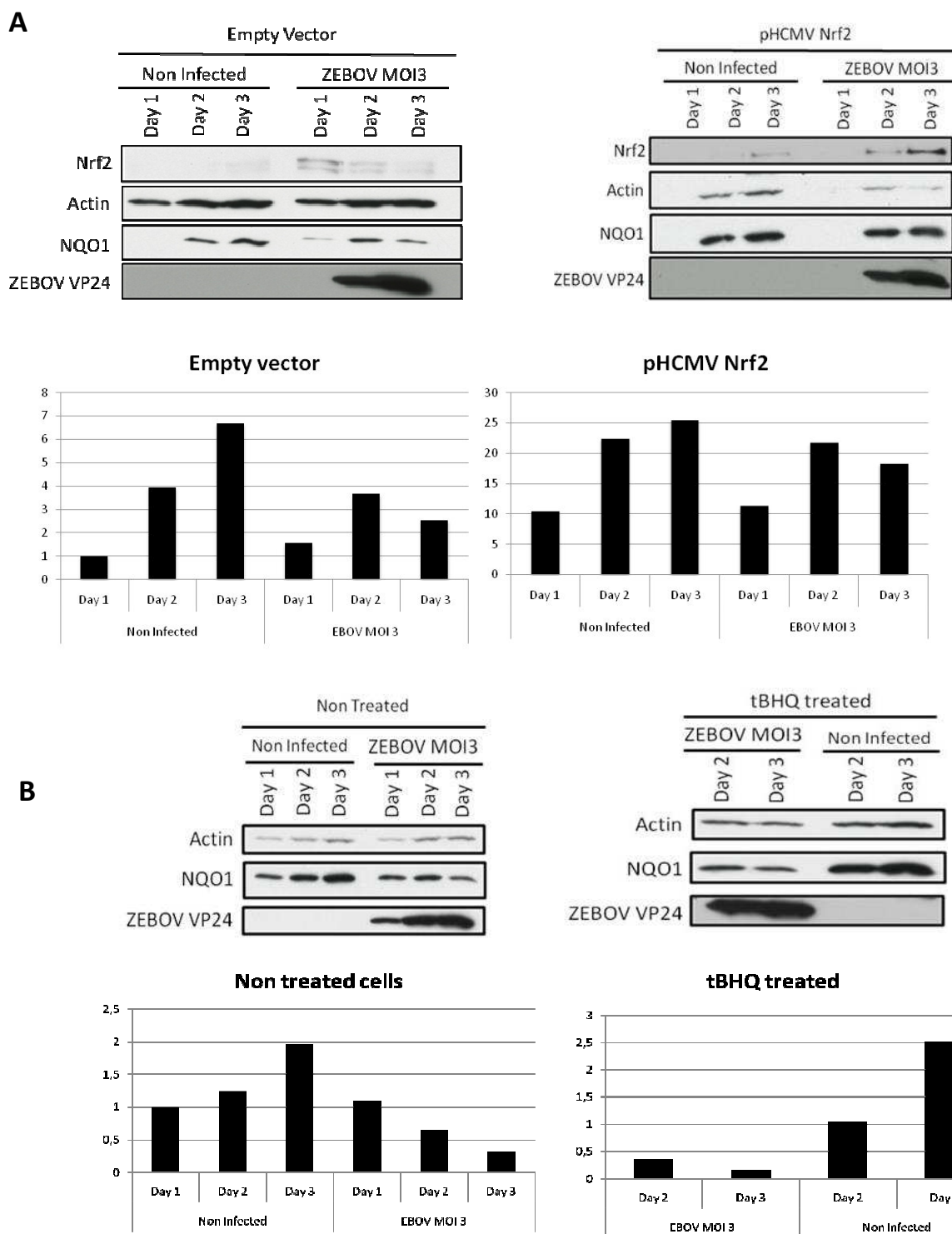


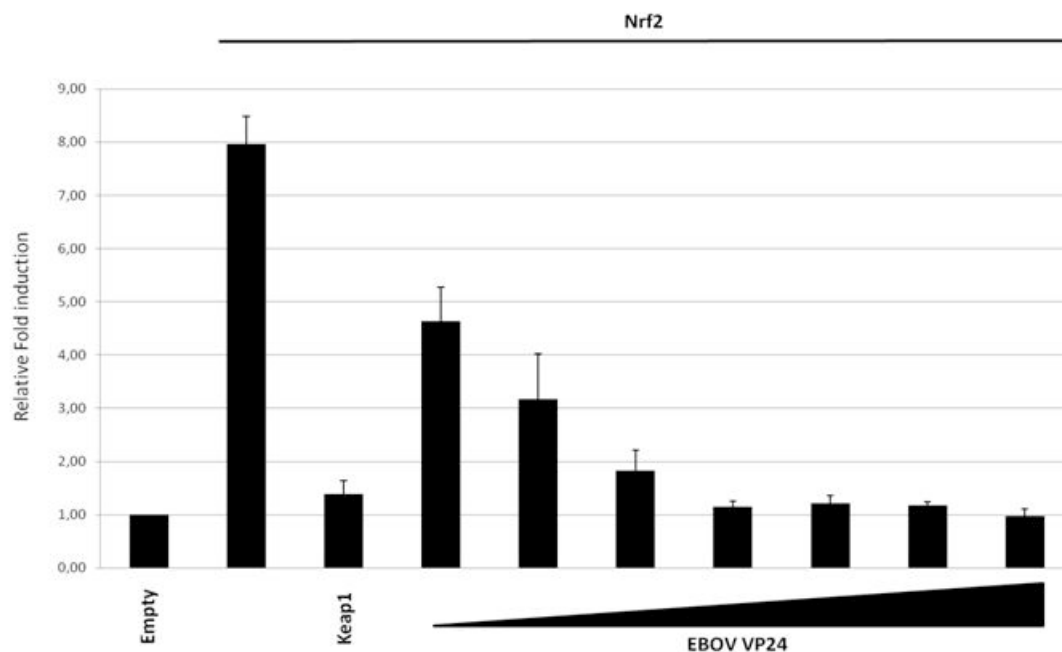
Figure R19: L'activité transcriptionnelle de Nrf2 est inhibée dans les cellules infectées par Ebola. (A) Des cellules 293T ont été transfectées par le pHCMV vide (panel de gauche) ou par le pHCMV-Nrf2 (panel de droite). 3h plus tard, ces cellules ont été infectées avec Ebola Zaïre (ZEBOV) à une Multiplicité d'Infection (MOI) de 3. 1, 2 et 3 jours après l'infection (day1, day2, day3), les cellules ont été lysées et un western blot pour NQO1, Nrf2, VP24 et l'actine a été réalisé. L'intensité du signal pour les bandes de NQO1 et d'actine a été évalué avec le Chemidoc XRS Imager (Biorad). Les valeurs d'intensité de NQO1 ont été normalisées par celles de l'actine, les graphiques représentent l'expression relative de NQO1 en comparaison à l'expression relative dans les cellules non infectées, transfectées par le vecteur vide, lysées à jour 1 (contrôle négatif). (B) Des cellules Vero E6 ont été infectées avec ZEBOV, à une MOI de 3, ou non. 24h plus tard, les cellules ont été gardées sans traitement (panel de gauche) ou traitées par une solution à 10µM de tBHQ dans du milieu de culture (panel de droite). Les cellules ont été lysées 1, 2 et 3 jours après l'infection et analysées comme en A (à l'exception du western blot anti-Nrf2 qui n'a pas été réalisé dans ce cas). L'expression relative de NQO1 a été comparée à celle du témoin négatif (cellules non traitées, non infectées, lysées à jour 1).

Afin d'évaluer l'impact de la VP24 d'EBOV sur le blocage de la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire, nous avons analysé l'activité du facteur Nrf2 en présence de la protéine VP24 d'EBOV. Pour ce faire, nous avons utilisé le même système de gène rapporteur que celui que nous avons employé pour l'étude de l'effet de la protéine VP24 de MARV (voir **Figure R10**). Dans un premier temps (**Figure R20A**), des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides pRTL, pHHO1-ARE-Luc, et les plasmides indiqués sur la figure : pHCMV-Nrf2, pSPORT6-Keap1, pHCMV-VP24EBOV). 24h plus tard, les activités Firefly Luciférase (inducible) et Renilla Luciférase (constitutive) ont été quantifiées et l'activité Firefly normalisée par l'activité Renilla, avant d'être comparée à la valeur du contrôle négatif (transfection par un plasmide vide, empty). Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression de Nrf2 induit l'activation de l'expression du gène rapporteur (Fold :8), par rapport à la transfection avec un plasmide vide. La surexpression simultanée de Keap1 et Nrf2 conduit à un retour à un niveau basal (Fold : 1,2). Ensuite, quand Nrf2 a été surexprimé avec des concentrations croissantes de VP24 et en absence de Keap1, l'activité du gène rapporteur a diminué au fur et à mesure que le taux de VP24 augmentait, jusqu'à retrouver un état basal proche de la valeur du contrôle négatif dès 50ng de pHCMV-VP24. L'activité du promoteur ARE semble donc inhibée de façon dose-dépendante par la protéine VP24 d'EBOV.

Afin de confirmer le rôle de la VP24 dans l'inhibition de Nrf2 au cours de l'infection par EBOV, nous avons alors souhaité analyser l'expression de NQO1 en présence de VP24 (**Figure R20B**). Des cellules 293T ont été transfectées soit par le plasmide vide, soit par deux concentrations différentes de pHCMV-VP24, seul (**Figure R20B**, panel de gauche) ou en présence du plasmide pHCMV-Nrf2 (**Figure R20B**, panel de droite). 24h, 48h et 72h après la transfection, les cellules ont été lysées et les lysats ont été analysés par western blot pour l'expression de la VP24, de l'actine, de Nrf2 et de NQO1. L'expression de NQO1 était seulement visible lorsque Nrf2 était surexprimé, mais beaucoup plus faiblement en présence de VP24, et ceci dès le premier jour après la transfection, contrairement à ce qui avait été observé lors de l'infection. Les résultats obtenus ici démontrent clairement que la protéine VP24 du virus Ebola est à l'origine d'un blocage de l'activité de Nrf2, de façon dose-dépendante.

De façon notable, la surexpression de la protéine Nrf2 en présence de la VP24 conduit à une stabilisation de Nrf2, c'est-à-dire qu'au cours du temps, la quantité de Nrf2 est augmentée et est supérieure à celle observée en absence de VP24. Ce résultat apparaît à la fois en conditions d'infection (**Figure R19A**, panel de droite) et de transfection (**Figure R20B**, panel de droite).

A



B

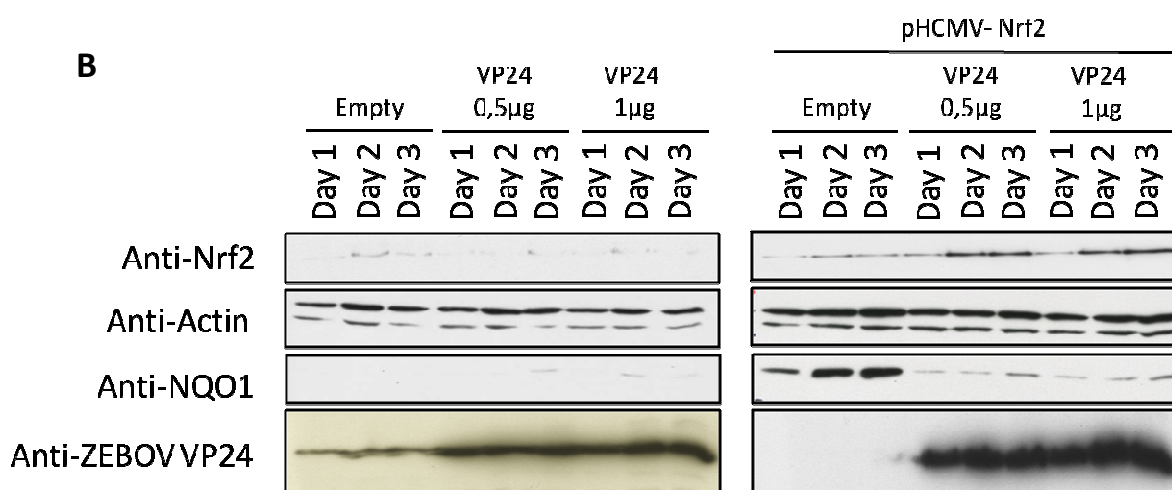


Figure R20 La protéine VP24 est responsable de l'inhibition de Nrf2. (A) Test d'expression d'un gène rapporteur luciférase. Des cellules 293T ont été transfectées avec pTKL, pHHO1-Luc, et les plasmides codants pour les protéines indiquées sur la figure (pHCMV-Nrf2, pSPORT6-Keap1, et des quantités croissantes de pHCMV-VP24EBOV : 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ng). Dans tous les cas, la quantité d'ADN apportée a été homogénéisée par ajout de vecteur vide. 24h après transfection, les valeurs de Firefly Luciférase ont été mesurées et normalisées par les valeurs de Renilla. Les résultats ont été comparés à l'activité normalisée de Firefly dans le contrôle négatif (Empty). Les valeurs représentées sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, et les barres d'erreur sont les écarts-type. (B) Analyse de l'expression de NQO1 en western blot. Des cellules 293T ont été transfectées avec la VP24 d'EBOV ou avec un plasmide vide, sans (panel de gauche) ou avec le plasmide codant pour Nrf2 (panel de droite). 1, 2 et 3 jours après la transfection, les cellules ont été lysées, puis un western blot a été réalisé pour analyser l'expression de NQO1, de l'actine, de Nrf2 et de la VP24.

Etude du mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition de Nrf2 par la VP24.

Il est alors apparu important de comprendre le mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition par la VP24 du facteur Nrf2. Dans la mesure où l'import nucléaire de la protéine Nrf2 est médié par la Karyophérine alpha 1 [362], et que cette protéine est un partenaire connu de la VP24 d'EBOV[95-97], nous nous sommes intéressés à la localisation intracellulaire de Nrf2 en présence de VP24. Pour ce faire, nous avons analysé la localisation cellulaire d'une protéine Nrf2 recombinante couplée à la GFP. Des cellules Vero ont été transfectées par le pEGFP-C2 dans lequel avait été cloné le gène de Nrf2, soit seul (**Figure R21A**), soit co-transfecté avec le plasmide codant pour la VP24 (**Figure R21B**). 16h après transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 1h avant d'être traitées avec 50µM de tBHQ ou avec une dilution de DMSO (1 :10000), contrôle de diluant. Le traitement a été poursuivi pendant 2h puis les cellules ont été analysées pour la localisation de Nrf2-GFP. Dans les cellules non traitées, Nrf2-GFP est distribuée de façon homogène à la fois au niveau nucléaire et cytoplasmique. Sous l'impact du traitement, Nrf2-GFP se relocalise strictement au niveau nucléaire (**Figure R21A**). Ce système permettait donc d'étudier le transport nucléo-cytoplasmique de Nrf2 et de mesurer l'impact de la VP24 sur ce transport. Lorsque Nrf2-GFP a été exprimé conjointement à la VP24, les cellules ont été traitées de la même façon, puis fixées avec une solution à 4% de PFA et perméabilisées par une solution de Triton X100. La VP24 a ensuite été marquée à l'aide de l'anticorps anti-VP24 et d'un anticorps secondaire anti-lapin Alexa 555 (rouge) selon le protocole d'immunofluorescence. La co-expression de Nrf2-GFP avec la VP24 d'EBOV induit une nouvelle distribution : en présence de VP24, Nrf2 semble s'accumuler dans le cytoplasme, au niveau de larges agrégats péri-nucléaires (**Figure R21B**, 1^{ère} ligne). Un traitement par la solution de tBHQ ne permet pas de détruire ces agrégats et d'induire une relocalisation nucléaire de Nrf2 dans les cellules où la VP24 est présente (**Figure R21B**, flèche jaune). Toutefois, dans les cellules où l'expression de VP24 est plus faible, l'induction de la translocation nucléaire de Nrf2 est visible (flèches blanches). Il semble donc que le facteur Nrf2 soit ségrégué par la VP24 au niveau cytoplasmique. De plus, les agrégats péri-nucléaires où est relocalisée Nrf2-GFP contiennent aussi la protéine VP24, ce qui indique que le blocage de l'activité de Nrf2 par la VP24 semble lié à une colocalisation de ces deux protéines au niveau péri-nucléaire, et par conséquent à une inhibition de la translocation nucléaire de Nrf2.

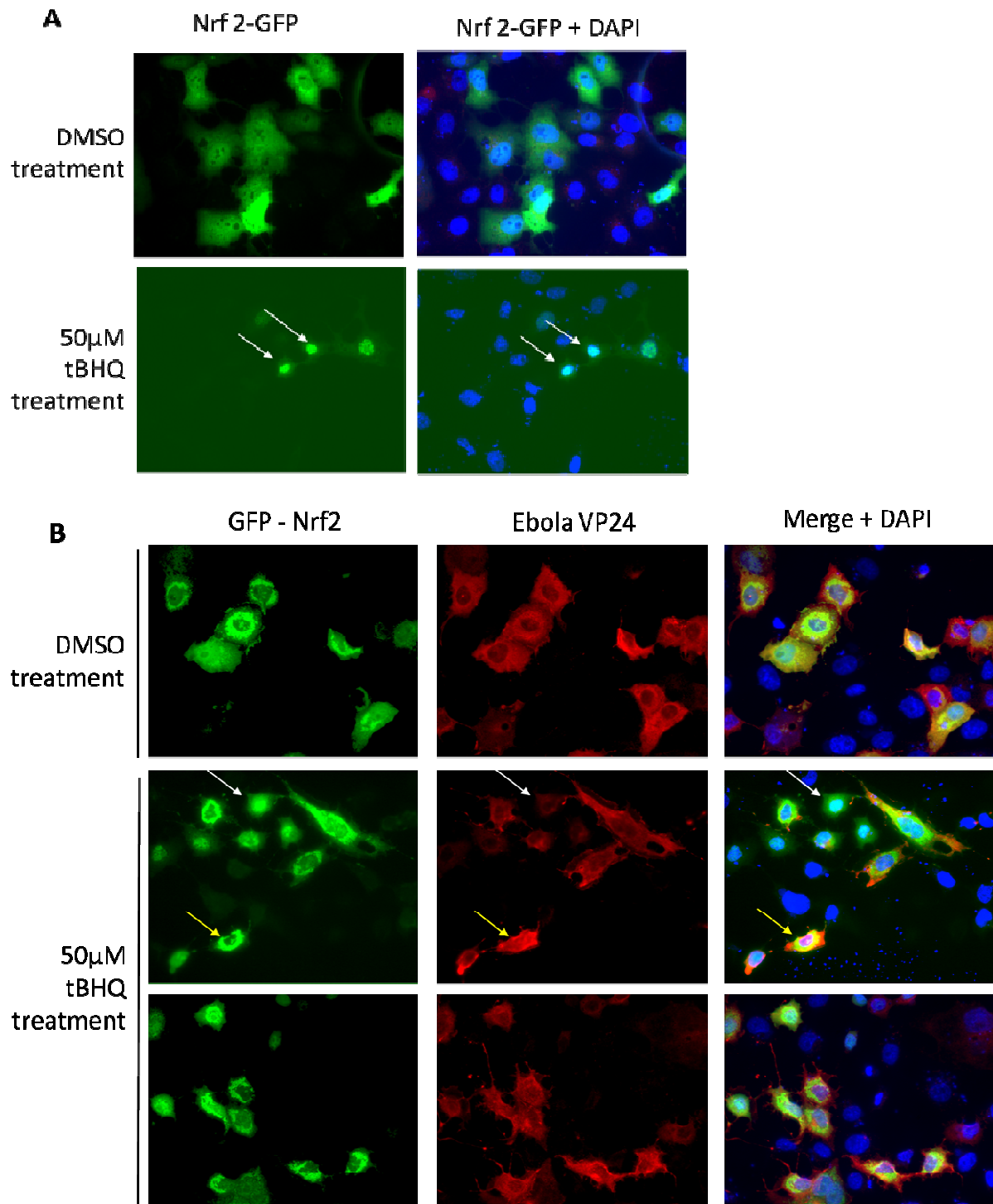


Figure R21: La protéine VP24 d'EBOV inhibe la translocation nucléaire de Nrf2. (A) Des cellules Vero ont été transfectées avec le pEGFP-Nrf2. 24h plus tard, les cellules ont été incubées 1h dans du milieu sans sérum avant d'être traitées avec une solution à 50µM de tBHQ dans du DMEM, ou avec une dilution de DMSO, comme contrôle de diluant. La translocation nucléaire de Nrf2 a été analysée 2h plus tard. (B) Immunofluorescence: Des cellules Vero ont été transfectées par un mélange de PHCMV-VP24 d'EBOV et pEGFP-Nrf2, puis traitées comme précédemment par une dilution de DMSO (ligne du haut) ou par une solution à 50µM de tBHQ (ligne du milieu et du bas). 2h après le traitement par tBHQ, les cellules ont été fixées par une solution de PFA à 4%, avant d'être perméabilisées avec du Triton X-100. Le marquage de la protéine VP24 a été réalisé comme indiqué dans la section matériels et méthodes, puis les lamelles ont été montées sur lame en utilisant le milieu de montage contenant du DAPI (ProLong Gold anti-Fade reagent –Invitrogen). Dans les deux cas, les images ont été obtenues à l'aide d'un Zeiss Axiovert Microscope, et l'analyse de ces images a été réalisée avec le logiciel Axiovision (Zeiss).

Cette colocalisation entre Nrf2-GFP et la VP24 d'EBOV suggère une interaction entre ces deux protéines. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation afin de confirmer cette hypothèse. Pour ce faire, des 293T ont été transfectées avec un plasmide pHCMV-VP24Z-myc, codant pour la protéine VP24 d'EBOV marquée par une étiquette myc (Ebo VP24-myc) et par le pHCMV-Nrf2 Nrf2, indépendamment ou en combinaison. 24h après transfection, les cellules ont été lysées et les lysats précipités à partir de l'épitope myc, à l'aide du kit c-myc tagged protein isolation kit (Miltenyi®), selon les instructions du fournisseur. Les lysats cellulaires (panel de gauche) ainsi que les éluats d'immunoprécipitations (panel de droite) ont été analysés par western blot pour Nrf2 et VP24. Les deux protéines sont bien exprimées dans les cellules (**Figure R22**, panel de gauche), et bien que l'immunoprécipitation de la VP24 ait été efficace, Nrf2 n'est pas détecté dans cette fraction. Dans notre système, les protéines VP24 d'EBOV et Nrf2 n'interagissent pas, contrairement à ce que nous avons supposé.

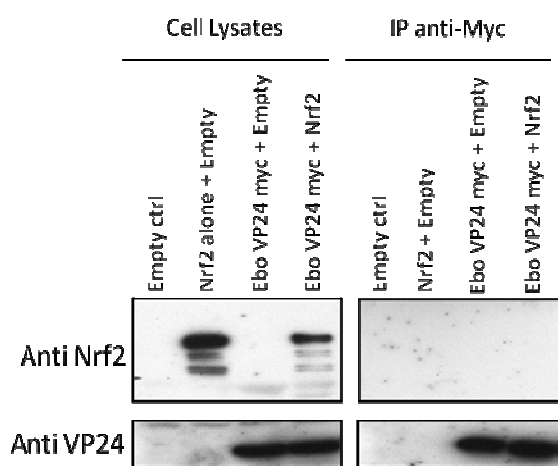


Figure R22: La VP24 d'EBOV ne lie pas Nrf2. Des cellules 293T ont été transfectées par un plasmide vide (pHCMV), par un plasmide codant pour Nrf2 (pHCMV-Nrf2), par un plasmide codant pour la VP24 fusionnée à un épitope myc (pHCMV-VP24myc), dans les combinaisons indiquées sur la figure. 24h plus tard, les cellules ont été lysées et les lysats soumis à une immunoprécipitation contre l'épitope myc avec le kit c-myc tagged protein isolation kit (Miltenyi). Les lysats cellulaires et les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot pour VP24 et Nrf2.

Keap1 est impliqué dans la dégradation protéasomique de Nrf2 et contrôle donc sa quantité intracellulaire. En présence de VP24 d'EBOV, nous avons constaté une accumulation de Nrf2. Dans la mesure où la protéine VP24 de MARV est capable de lier la protéine Keap1 (cf 1^{ère} partie), et où Keap1 agit comme un inhibiteur de Nrf2, nous avons évalué la capacité de la VP24 d'EBOV à interagir avec Keap1, dans le but d'expliquer le mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition du facteur Nrf2 et son accumulation intracellulaire en présence de VP24. Dans un premier temps, nous avons analysé la localisation cellulaire de ces deux facteurs. Des cellules Vero ont été transfectées par les plasmides pHCMV-VP24 et pSPORT6-Keap1. 16h plus tard, les cellules ont été fixées par une solution de PFA à 4%, perméabilisées par une solution de TRITON X-100 et un marquage de chacune des protéines avec un anticorps primaire spécifique a été réalisé (**Figure R23A**). Un anticorps Alexa anti-lapin 488 (vert, marquage anti-VP24) et un anticorps anti-chèvre 555 (rouge, marquage anti-Keap1) ont été employés. Les lames d'immunofluorescence ont été analysées comme décrit précédemment.

Comme attendu, la protéine VP24 d'EBOV exprimée seule, forme des agrégats péri-nucléaires massifs, tandis que Keap1 se répartit de façon homogène dans tout le cytoplasme. La co-expression des deux protéines ne semble pas induire de changement majeur dans le schéma de leur localisation. Toutefois, une fraction de la protéine VP24 qui n'est pas agrégée se retrouve de façon diffuse dans le cytoplasme au même endroit que Keap1, comme l'indique la superposition des deux marquages.

Afin de conclure formellement quant à l'interaction entre Keap1 et la protéine VP24 d'EBOV, nous avons ensuite réalisé une expérience d'immunoprécipitation (**Figure R23B**). Des cellules 293T ont été transfectées avec le pHCMV vide, pSPORT6-Keap1, pHCMV-VP24-myc d'EBOV et pHCMV-VP24-myc de MARV, dans les combinaisons indiquées sur la figure. 24h plus tard, les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre l'étiquette myc a été réalisée de la même façon que dans les expériences précédentes. Les éluats d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot pour les VP24 et pour Keap1. De même que précédemment, l'immunoprécipitation anti-myc de la VP24-myc de MARV contient la protéine Keap1, reflétant une forte interaction entre ces deux protéines. Par contre, l'immunoprécipitation de la VP24-myc d'EBOV ne contient pas plus de Keap1 que le contrôle négatif, ce qui indique que dans notre système, les protéines VP24 d'EBOV et Keap1 n'interagissent pas.

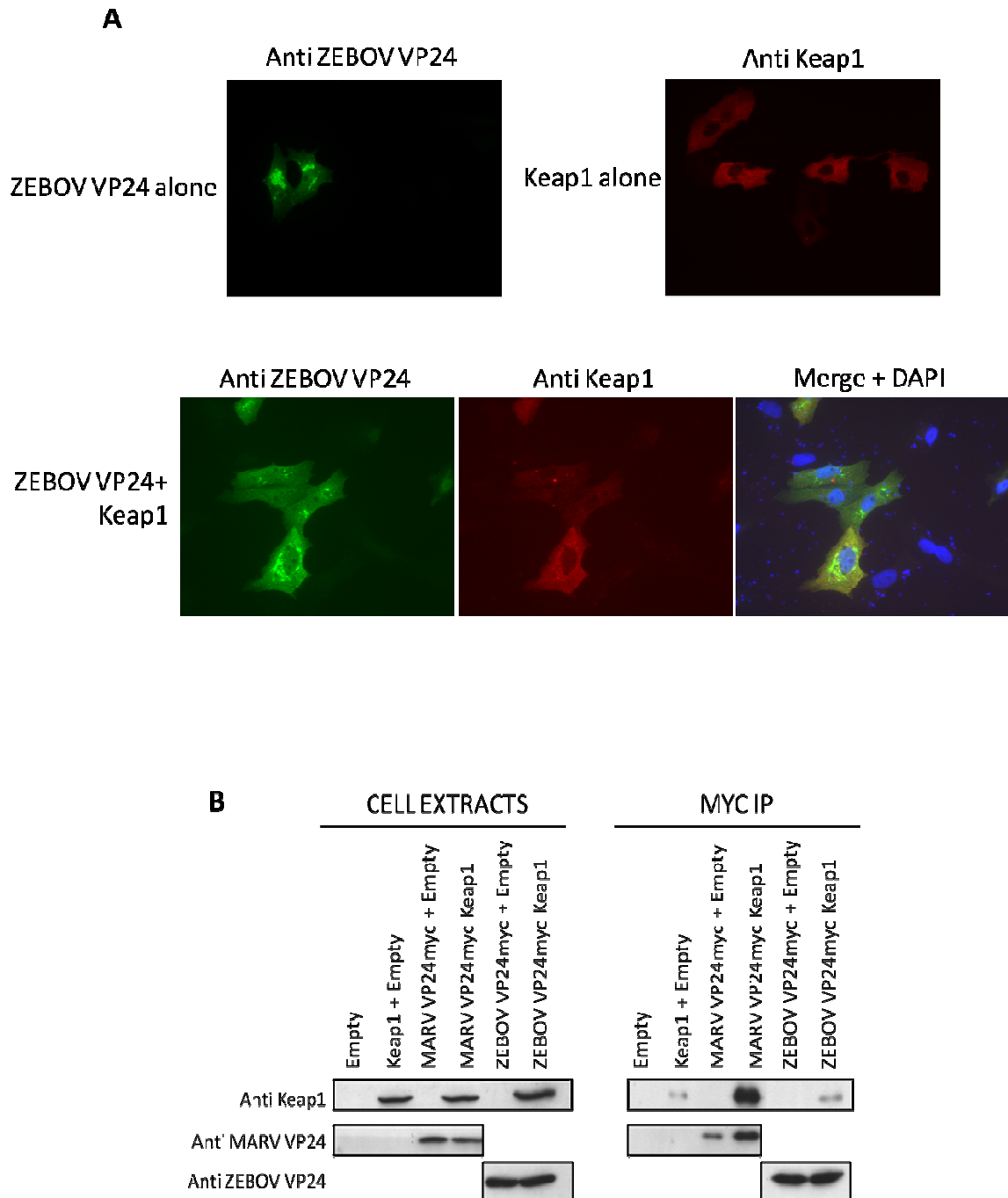


Figure R23 : La protéine VP24 d'EBOV n'interagit pas avec Keap1. (A) Analyse par immunofluorescence des cellules Vero transfectées par pSPORT6-Keap1 ou pHCMV-VP24 (ligne du haut), ou par les deux plasmides ensemble (ligne du bas). 16h après transfection, les cellules ont été fixées par une solution à 4% de PFA puis perméabilisées par une solution à 0,1% de triton X-100, avant d'être soumises à un marquage pour les protéines VP24 et Keap1, comme indiqué dans la section matériels et méthodes. Les lames ont alors été traitées et analysées comme indiqué précédemment (B) Test d'immunoprécipitation. Des cellules 293T ont été transfectées par le pHCMV vide, pSPORT-Keap1, pHCMV-VP24MARV-myc et pHCMV-VP24EBOV-myc, dans les combinaisons indiquées sur la figure. 24h plus tard, les cellules ont été lysées et les lysats soumis à une immunoprécipitation dirigée contre l'épitope myc. Les lysats cellulaires et les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot pour Keap1, et pour les VP24 d'EBOV et de MARV (utilisé ici comme contrôle positif d'interaction avec Keap1).

Recherche des partenaires cellulaires des protéines VP24 des virus Ebola Zaïre et Ebola Reston et identification d'une nouvelle cible de la VP24.

Nos essais précédents de compréhension du mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition du facteur Nrf2 par la VP24 d'EBOV se sont révélés infructueux. Aussi, afin de tenter d'identifier un facteur cellulaire qui serait la clé de cette inhibition, et également afin de mieux comprendre le fonctionnement de la VP24 dans la cellule infectée, nous avons recherché les partenaires cellulaires de la VP24 du virus EBOV Zaïre, ainsi que du virus EBOV Reston. Pour ce faire, un crible double hybride en levures a été réalisé pour les deux protéines. Pour l'espèce Zaïre d'EBOV, le fragment amino-terminal de la VP24, constitué des résidus 1 à 212 a également été testé pour les interactions protéiques qu'il peut former. Ce fragment contient des résidus impliqués dans la liaison aux Karyophérines [97]. Les trois séquences ont été fusionnées au domaine GAL4BD par clonage dans le plasmide pPC97 par la technique de clonage Gateway (Invitrogen®). Les plasmides ont ensuite été insérés dans des levures par transformation. Le crible a été réalisé de même que précédemment pour la protéine VP24 de MARV, contre une banque d'ADNc de rate humaine, clonée au préalable dans le vecteur pPC86. L'approche expérimentale du crible double hybride en levures est présentée **Figure R1**. Dans tous les cas, le crible a été validé puisque le nombre de levures portant les deux plasmides (dites diploïdes) était supérieur à 15×10^6 . Par la suite, les produits de crible ont été cultivés sur milieu sélectif. Le crible de la protéine VP24 d'EBOV Zaïre a donné 10 colonies, et celui de sa portion N-terminale en a donné 8. De façon surprenante, le crible avec la protéine VP24 du virus EBOV Reston a donné 94 clones. Pour tous ces clones, les séquences ont été analysées par BLAST pour l'identification du partenaire humain. Les résultats sont présentés **Tableau R2**. Les KPNA1, 5 et 6 ont été retrouvées dans le crible pour les protéines VP24 Zaïre et Reston entières, comme il avait été démontré précédemment. Concernant le fragment amino-terminal de la VP24 du virus Ebola Zaïre, seule la KPNA1 a été identifiée.

Human interactor (Accession Number)	VP24Z	VP24ZN	VP24R
KPNA1 (NP_002255.2) <i>Karyopherin alpha 1</i>	1	0	40
KPNA5 (NP_002260.2) <i>Karyopherin alpha 5</i>	4	1	11
KPNA6 (NP_036448) <i>Karyopherin alpha 6</i>	1	0	13
NCKIPSD/SPIN90 (NP_909119) <i>NCK Interacting Protein with SH3 Domain</i>	3	6	20
GNLY (NP_036615) <i>Granulysin Isoform 519</i>	1	0	0
DYNLL (NP_003737) <i>Dynein Light Chain 1</i>	0	1	0
C3orf10/HSPC300 (NM_018462) <i>Haematopoietic Stem/Progenitor Cell protein 300</i>	0	0	2
MYH2 (NP_001093582) <i>Myosine, Heavy Chain 2</i>	0	0	4
OVCA (NP_543012) <i>Candidate Tumor Suppressor in Ovarian Cancer</i>	0	0	1
PSMD2 (NP_002799) <i>26S proteasome non ATPase regulatory subunit 2</i>	0	0	1

Tableau R2: Résultats du crible double hybride en levures pour la protéine VP24 du virus Ebola Zaïre entière (VP24Z), son extrémité N-terminale (VP24ZN) et pour la VP24 du virus Ebola Reston entière (VP24R). Les nombres indiquent le nombre de clones de levures recensés pour chaque partenaire cellulaire.

Nous avons ensuite tenté de séparer les partenaires potentiels en fonction de leurs caractéristiques biologiques (**Tableau R3**).

Outre le groupe principal des protéines impliquées dans le transport dans le noyau, composé des KPNA, nous avons pu former un deuxième groupe de protéines, impliquées dans l'organisation et le réarrangement du cytosquelette cellulaire. Ces protéines sont retrouvées à une fréquence de 31,8%. En particulier, une redondance importante fut observée pour la protéine cellulaire SPIN90 (*SH3 Protein Interacting with Nck, 90 kDa*, numéro d'accèsion Pubmed NP_909119), retrouvée dans 23% de nos cribles, et autant pour Ebola Zaïre que pour Ebola Reston. Cette protéine est connue pour jouer un rôle important dans la formation du réseau d'actine [420-422]. Elle a tout d'abord été découverte comme partenaire moléculaire de Nck [421], et joue un rôle clé dans les réarrangements du cytosquelette, dans la mesure où elle lie des protéines impliquées dans la formation du réseau d'actine telles que Nck, betaPix, WASP, et la dynamine [422]. En particulier, elle semble importante pour la formation des Filopodes à la membrane cellulaire [189]. D'autres protéines identifiées ici jouent un rôle important dans la modulation du cytosquelette, c'est le cas de C3ORF10, aussi appelée HSPC300 (Haematopoietic Stem/Progenitor Cell Protein 300) [423], de la chaîne lourde de la Myosine (MYH2) [424], de la DYNLL-LC8 (*Dynein Light Chain LC8*).

Human interactor	Occurrence (%)	Interactor Properties & Function	Total occurrence (%)
KPNA1	37,27		
KPNA5	14,54	Nucleo-cytoplasmic shuttling Interferon pathway	
KPNA6	12,72		64,53
SPIN90	26,36		
C3ORF10	1,8		
MYH2	3,63	Cytoskeleton arrangement & organisation	
DYNLL	0,9		31,79
GNLY	0,9	Immune response & Cell death	0,9
OVCA2	0,9		
PSMD2	0,9	Miscellaneous	1,8

Tableau R3: Tri des partenaires cellulaires potentiels identifiés par le crible en fonction de leurs caractéristiques biologiques. Cette analyse met en évidence une fréquence élevée des protéines impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique (Karyophérines), et des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette.

Compte tenu de la forte redondance du facteur SPIN90 dans le crible, nous avons ensuite cherché à confirmer sa capacité à interagir avec la VP24 dans des cellules de mammifères. Dans un premier temps, l'interaction physique entre la VP24 et SPIN90 a été confirmée. Pour ce faire, des cellules 293T ont été transfectées par le pHCMV-VP24 d'EBOV et le pHCMV-Flag-SPIN90, ensemble ou séparément. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre l'épitope Flag a été réalisée. Les lysats ainsi que les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot dirigé contre la VP24 ou contre l'épitope Flag, marqueur de la protéine SPIN90. La protéine VP24 est retrouvée dans les éluats d'immunoprécipitation seulement en présence de SPIN90-Flag, témoignant d'une interaction entre la VP24 et SPIN90 (**Figure R20 A**).

Nous avons alors analysé la localisation cellulaire de ces deux partenaires exprimés individuellement ou en combinaison (**Figure R20 B**). Des cellules Vero ont été transfectées par le pHCMV-VP24 et par le pHCMV-Flag-SPIN90, séparément (ligne du haut) ou ensemble (ligne du bas). 16h après transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées, puis un marquage dirigé contre la VP24 et contre l'épitope Flag a été réalisé. Des anticorps secondaires anti-lapin (rouge, spécifique de la VP24) et anti-souris (vert, spécifique de SPIN90) ont été utilisés pour révéler les protéines. Le facteur SPIN90, exprimé seul, a une distribution homogène dans le cytoplasme, comme il a été montré par ailleurs [420]. La protéine VP24 d'EBOV, exprimée seule, forme des agrégats périnucléaires, comme nous l'avions observé dans les expériences précédentes. La co-expression des deux protéines induit une relocalisation du facteur SPIN90 dans les agrégats formés par la VP24, ce qui met en évidence une colocalisation des deux partenaires. De plus, il semble que les deux protéines colocalisent également à la membrane cytoplasmique (flèche blanche). Pris ensemble, ces résultats confirment l'interaction entre la protéine VP24 du virus Ebola et le facteur cellulaire SPIN90.

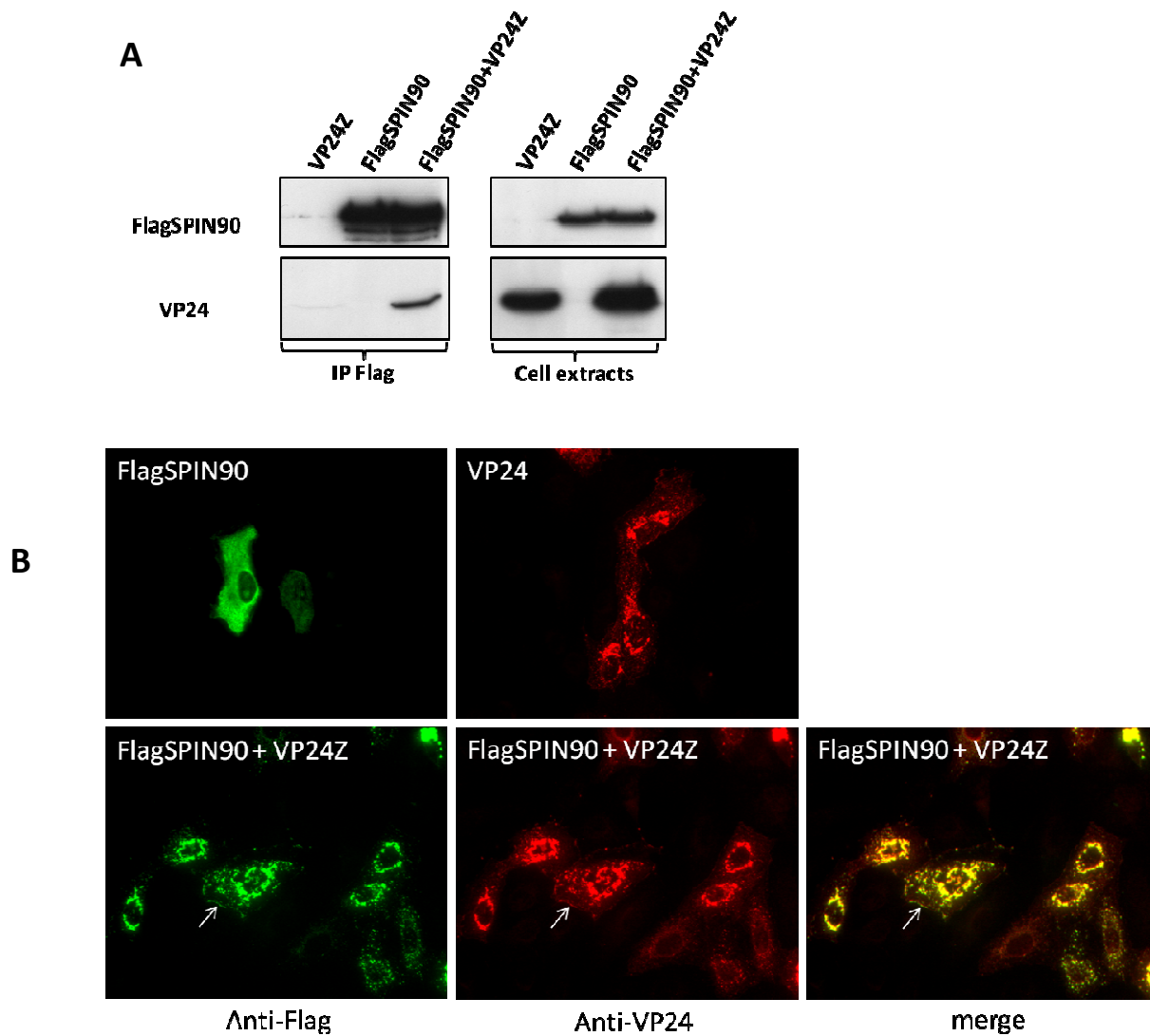


Figure R24. Les protéines SPIN90 et VP24 du virus Ebola interagissent dans un modèle de cellules mammifères. (A) Test d'immunoprécipitation: des cellules 293T ont été transfectées par les plasmides codants pour ZEBOV VP24 (VP24Z) et pour FlagSPIN90, séparément ou ensemble. 24h plus tard, les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation ciblant l'épitope Flag a été réalisée. Les lysats cellulaires (cell extracts), ainsi que les produits d'immunoprécipitation (IP Flag) ont ensuite été analysés par western blot pour la VP24 et pour SPIN90. (B) Immunofluorescence: des cellules Vero E6 ont été transfectées avec les mêmes plasmides qu'en A. 16h plus tard, les cellules ont été analysées pour déterminer la localisation cellulaire des protéines surexprimées, en utilisant un marquage des cellules fixées avec un anticorps anti-Flag et un anticorps anti-VP24.

DISCUSSION

Lorsqu'il est attaqué par une infection parasitaire, virale ou bactérienne, l'organisme possède plusieurs mécanismes de défense, regroupés sous le terme d'immunité innée, et parmi ceux-ci, la libération d'ERO est un moyen efficace de contrôler le microbe et sa dispersion. Les ERO sont libérées par les macrophages, les neutrophiles et les autres cellules phagocytaires et peuvent conduire soit à la mort de la cellule infectée, soit à la mort de l'agent infectieux. Ce système peut être mis en place rapidement après l'infection et ainsi, permet un contrôle rapide de la dispersion de l'agent infectieux au sein de l'organisme. Afin de contrôler les dommages liés à la libération massive des ERO dans le cadre de la réponse immunitaire innée, les cellules sont dotées d'un système permettant la détoxification cellulaire de façon rapide et efficace, il s'agit de la voie Keap1-Nrf2. Cette voie de transduction permet de détecter la présence d'ERO intracellulaires, de libérer le facteur Nrf2 pour induire la synthèse d'enzymes impliquées dans la réduction des molécules oxydantes, conduisant ainsi à la survie de la cellule et à un retour à un équilibre d'oxydoréduction intracellulaire.

Pour réussir sa réplication, sa dispersion dans l'organisme hôte et sa transmission à d'autres organismes, l'agent infectieux doit trouver des moyens d'échapper au système immunitaire de l'hôte et en particulier à éviter les dommages causés par les ERO. Pour ce faire, certains microorganismes possèdent leur propre arsenal de molécules de résistances au stress oxydant (pour revue, voir [425]), ce qui leur permet de survivre dans un environnement défavorable. Dans certains cas, et notamment lors d'infections virales, le virus doit moduler la voie Keap1-Nrf2 afin de favoriser la survie de la cellule qu'il infecte et ainsi, sa propre réplication.

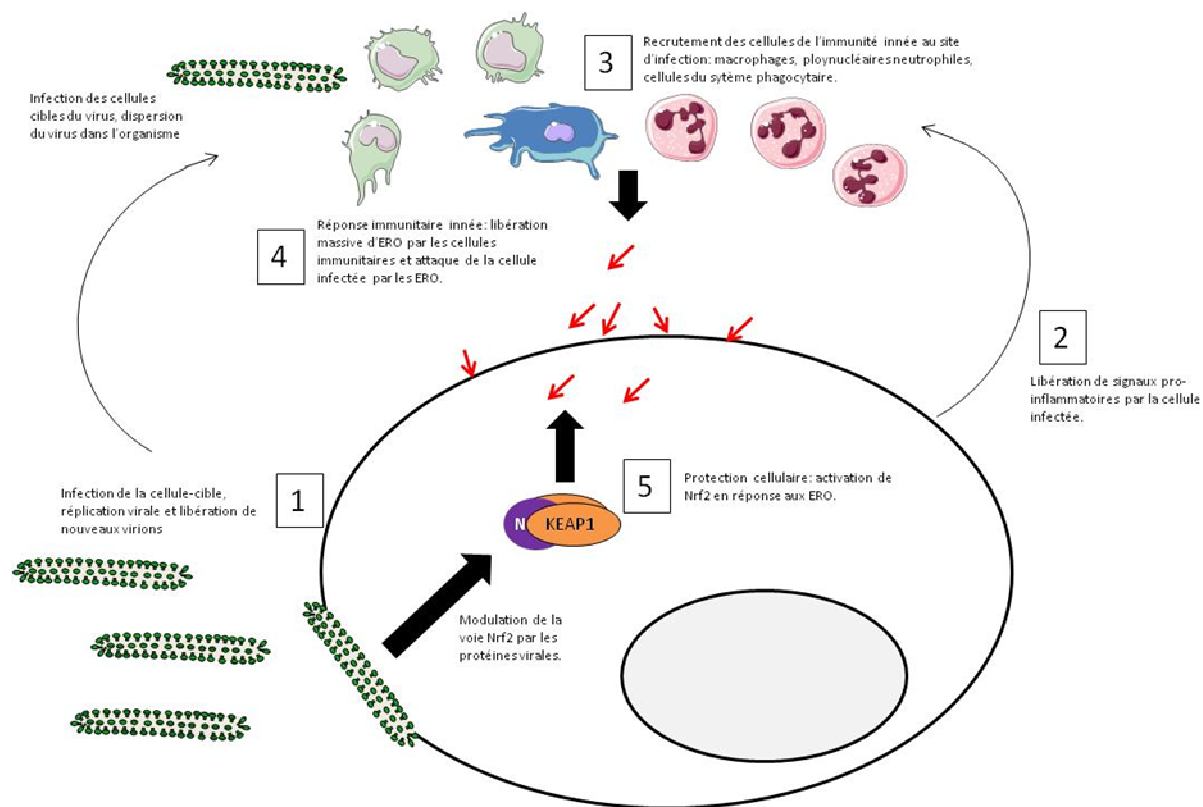


Figure D1 : Infection, infiltration des cellules de l'immunité innée et libération d'ERO pour lutter contre l'infection virale. Lorsqu'une cellule est infectée par un Filovirus (1), elle libère des quantités importantes de médiateurs de l'inflammation (2) qui vont recruter les macrophages, cellules phagocytaires et neutrophiles au site d'infection (3). Ces cellules vont mettre en place la réponse immunitaire innée, notamment en libérant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui vont attaquer les cellules infectées (4). Ces ERO peuvent être contrées par l'activité cellulaire de la voie Keap1-Nrf2 (5), elle-même modulée par les protéines virales. En parallèle, les nouveaux virions formés vont aller infecter les macrophages recrutés au site d'infection pour induire la dispersion du virus dans l'organisme.

Lors de l'infection par les Filovirus, les cellules capables de libérer des ERO (macrophages et neutrophiles) sont attirées au site de réplication du virus par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules vont s'infiltrer dans les tissus infectés [263] et s'accumuler au site de l'infection. Cette attraction des cellules de l'immunité innée au site de l'infection a été expliquée auparavant comme un moyen de favoriser la dispersion des particules virales dans l'organisme, mais résulte en la libération massive d'ERO et de NO (Voir **Figure D1**). En théorie, cette libération massive de médiateurs de l'inflammation devrait résulter en la mort de la cellule infectée, et par conséquent à l'arrêt de la réplication virale. Pourtant des études comparatives ont montré que des taux de NO sont élevés dans les cas d'infections fatales par le virus Ebola Soudan [116], suggérant que les ERO n'empêchent pas une réplication massive d'EBOV. Dans cette étude, nous démontrons que les Filovirus sont capables de moduler la réponse cellulaire au stress oxydatif, et donc de contrôler les dommages qui pourraient être infligés aux cellules qu'ils infectent en modulant cet aspect de la réponse immunitaire innée. A cette fin, au point de vue moléculaire, un contrôle de la voie Keap1/Nrf2 par les protéines VP24 est mis en évidence.

La protéine VP24 du virus de Marburg active le facteur Nrf2 et la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire.

Dans notre étude, le rôle de la protéine VP24 de MARV a été analysé en détail, et nous identifions une nouvelle fonction pour cette protéine. En utilisant un système de crible double-hybride en levures, nous avons mis en évidence le premier partenaire cellulaire de la VP24, la protéine Keap1. De façon intéressante, notre crible révèle également que la protéine VP24 pourrait également interagir avec PGAM5 (Tableau R1), une autre cible cellulaire de Keap1. Il serait intéressant de confirmer l'interaction entre PGAM5 et la VP24 pour établir de nouvelles hypothèses quand à l'importance du ciblage de Keap1 par la protéine VP24.

L'interaction entre Keap1 et la VP24 a ensuite été confirmée en cellules humaines (Figure R3), et cette interaction s'est avérée si forte que la protéine Keap1 endogène, qui n'est pas détectée en western blot normalement, peut être immunoprécipitée et détectée en sur-exprimant la protéine VP24 (Figure R4). La structure la protéine Keap1 est bien connue, et cette protéine possède dans sa moitié carboxy-terminale un domaine Kelch qui se structure en corolle pour accueillir les cibles de Keap1 pour l'ubiquitination. L'utilisation de mutants de délétion du domaine Kelch (Figures R6), ainsi que de mutants de substitutions qui perturbent l'interaction entre Keap1 et Nrf2 (Figure R7), révèle que la VP24 lierait Keap1 au niveau de son domaine de liaison à Nrf2. De plus, cette liaison fait intervenir des résidus similaires à ceux impliqués dans la liaison à Nrf2. Dans ce contexte, nous avons supposé que la présence de la VP24 affectait l'activité de Keap1 sur la protéine Nrf2. Dans la mesure où VP24 et Nrf2 se lient à Keap1 au même endroit, une compétition entre Nrf2 et VP24 pour le domaine Kelch de Keap1 est supposée. Toutefois, en raison de la stœchiométrie de l'interaction entre Keap1 et Nrf2, la VP24 pourrait ne pas abolir complètement cette interaction. En effet, la protéine Nrf2 possède deux sites de liaison à Keap1 (une séquence ETGE, de forte affinité, et une séquence DLG, d'affinité plus faible), chacun interagissant avec un domaine Kelch, les deux molécules de Keap1 étant associées sous forme d'homodimère. Ce système de double reconnaissance est nécessaire pour étirer le domaine Neh2 de Nrf2, afin de rendre ses résidus Lysine accessibles pour l'Ubiquitination, qui sera effectuée par CUL3. La VP24 pourrait donc cibler un des deux domaines Kelch impliqués dans l'interaction avec Nrf2, mais laisser le deuxième domaine disponible pour la liaison à Nrf2. L'interaction Keap1-Nrf2 ne serait donc pas abolie par la présence de VP24, mais un complexe tri-partite serait formé. En conséquence, Nrf2 ne serait plus ubiquitinylé, et donc sa dégradation serait empêchée, résultant en son activation. Il serait donc intéressant de déterminer si la présence de la protéine VP24 abolit totalement la liaison Keap1-Nrf2, où si elle empêche seulement l'ubiquitination de Nrf2, en liant un seul des deux domaines Kelch de Keap1, ou encore si elle induit la dissolution du dimère Keap1-Keap1, rendant son action d'adaptateur de CUL3 à Nrf2 impossible (voir **Figure D2**). A cette fin, des études complémentaires faisant intervenir des mutants de Nrf2, ainsi que l'identification des résidus de la VP24 impliqués dans son interaction avec Keap1 sont nécessaires. De même des tests biochimiques visant à déterminer l'affinité entre le domaine Kelch de Keap1 et la séquence de VP24 qui s'y lie, et la comparaison avec l'affinité des séquences DLG et ETGE de Nrf2 permettront certainement de déterminer le mécanisme moléculaire précis d'interaction entre Keap1 et VP24.

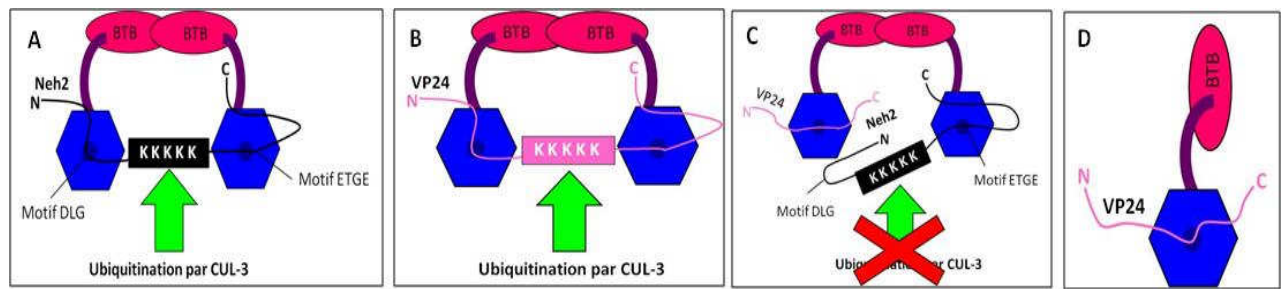


Figure D2. Modèles possibles d'interaction entre Keap1 et la protéine VP24 du virus de Marburg. A : La protéine Keap1 s'associe sous forme dimérique pour lier Nrf2 par ses domaines ETGE et DLG afin de permettre son ubiquitination via CUL3. B : Modèle hypothétique où la protéine VP24 se substituerait à Nrf2, et lierait 2 molécules de Keap1, potentiellement pour être ubiquitinylée par CUL3 à son tour. C : Modèle hypothétique où l'affinité de la protéine VP24 pour le domaine Kelch de Keap1 serait supérieure à celle du domaine DLG de Nrf2, mais inférieure à celle du domaine ETGE, résultant en la formation d'un complexe tripartite. D : Modèle hypothétique où l'encombrement stérique de la protéine VP24 empêcherait l'interaction entre 2 molécules de Keap1, la rendant inactive pour la présentation du substrat à CUL3.

Ces résultats futurs permettront également de comprendre l'importance de l'interaction entre Keap1 et VP24 en regard du cycle réplcatif viral. En effet, nous montrons ici que la protéine VP24 se lie à Keap1, qui est un adaptateur d'une Ubiquitine Ligase, CUL3. De nombreuses protéines virales sont ubiquitinylées afin de permettre la réplcation virale. Il est donc probable qu'en se liant à Keap1, la protéine VP24 subisse également cette modification. L'analyse de l'importance de CUL3 dans le cycle réplcatif viral, ainsi que de l'état d'ubiquitination de la VP24 permettra certainement de conclure quand au devenir intracellulaire de la VP24. Notamment l'ubiquitination de la VP24 de MARV pourrait jouer un rôle important pour le transport des RNP et le bourgeonnement, comme il a été établi pour la VP40 d'EBOV [426]. Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que Keap1 est l'adaptateur de CUL3 pour d'autres protéines cellulaires (dont par exemple PGAM5 [356] et Bcl-2 [361]). Il serait donc intéressant d'analyser le devenir de ces protéines en présence de la protéine VP24 de MARV, afin de conclure de façon formelle sur la capacité de VP24 à inactiver la protéine cellulaire Keap1.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'activité de Nrf2 en présence de la protéine VP24 de MARV. Les hypothèses que nous avons à ce moment là étaient que l'interaction Keap1-VP24 pourrait résulter soit en une activation de Nrf2 par un blocage de Keap1, soit en une inhibition de l'activité de Nrf2, par exemple en favorisant sa dégradation. Afin de tester la première hypothèse, Nrf2 a été surexprimé seul (contrôle positif d'activation), ou conjointement à Keap1 (inhibition de Nrf2), puis des quantités croissantes de VP24 de MARV ont été introduites. Les cellules ainsi transfectées ont été testées pour la capacité de Nrf2 à lier l'ADN (Figure R9), et pour l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur ARE (Figure R11). Les tests fonctionnels que nous avons ainsi réalisés démontrent que la VP24 est capable de contrecarrer l'inhibition Keap1 dépendante du facteur Nrf2, conduisant (i) à la translocation nucléaire de Nrf2 comme en atteste le test de liaison à l'ADN, (ii) à l'activation de la synthèse de protéines sous la dépendance du promoteur ARE, comme en témoignent nos essais luciférase. Nous avons alors voulu confirmer la capacité de la protéine VP24 de MARV à activer le facteur Nrf2 endogène, afin de se rapprocher le plus possible des conditions infectieuses. Pour ce faire, nous avons analysé la synthèse de NQO1, une cible de Nrf2, consécutivement à la surexpression de VP24. Nos résultats ont confirmé l'activation de Nrf2 démontrée dans les expériences précédentes (Figure R12B). Afin de s'assurer de la spécificité de l'activation, nous avons également sur-exprimé une autre protéine virale, la VP30 d'EBOV, et nous

constatons que cette surexpression n'entraîne pas de changement sur le taux de NQO1 intracellulaire (Figure R13). L'activation de Nrf2, conduisant à la synthèse de NQO1 est donc spécifique de la présence de la protéine VP24 de MARV. Nous démontrons donc ici qu'en se liant au domaine Kelch de Keap1, la protéine VP24 de MARV induit l'activation de Nrf2, conduisant à la synthèse de protéines anti-oxydantes, telles que NQO1. La protéine VP24 permettrait donc d'induire un état « anti-oxydant » dans les cellules où elle est exprimée (Voir **Figure D3**).

L'induction de cet état « anti-oxydant » a ensuite été confirmée par l'augmentation de la synthèse de la protéine NQO1 au cours de l'infection à MARV (Figure R12A). Ce résultat est donc venu confirmer, dans le cadre de l'infection virale, ce qui avait été au préalable montré en conditions de transfection. Nous supposons que l'induction de cet état lors de l'infection par MARV permettrait de protéger les cellules contre les dommages environnementaux. En effet, les études *in vivo* ont montré que dans le cadre de l'infection par les Filovirus, de fortes quantités de NO, et de cytokines pro-inflammatoires [61] sont relâchées et devraient conduire à la mort des cellules infectées. Ainsi, l'activation du facteur Nrf2 dans les cellules infectées par MARV permettrait de préparer ces cellules aux attaques des ERO et des électrophiles, et ainsi de former « une niche protectrice » où le virus pourrait se répliquer sans souffrir des contraintes environnementales. Dans ce contexte, l'activation de Nrf2 serait un mécanisme d'échappement du virus aux réponses de l'hôte (voir **Figure D3**). De plus les cellules infectées seraient favorisées par rapport aux cellules non-infectées, ce qui faciliterait la réplication virale et la production de nouveaux virions. Ce modèle est en adéquation avec les résultats déjà obtenus pour le VHB et le VHC, qui semblent capables d'induire la voie Nrf2 pour prolonger la durée de vie des cellules infectées [404, 405, 427].

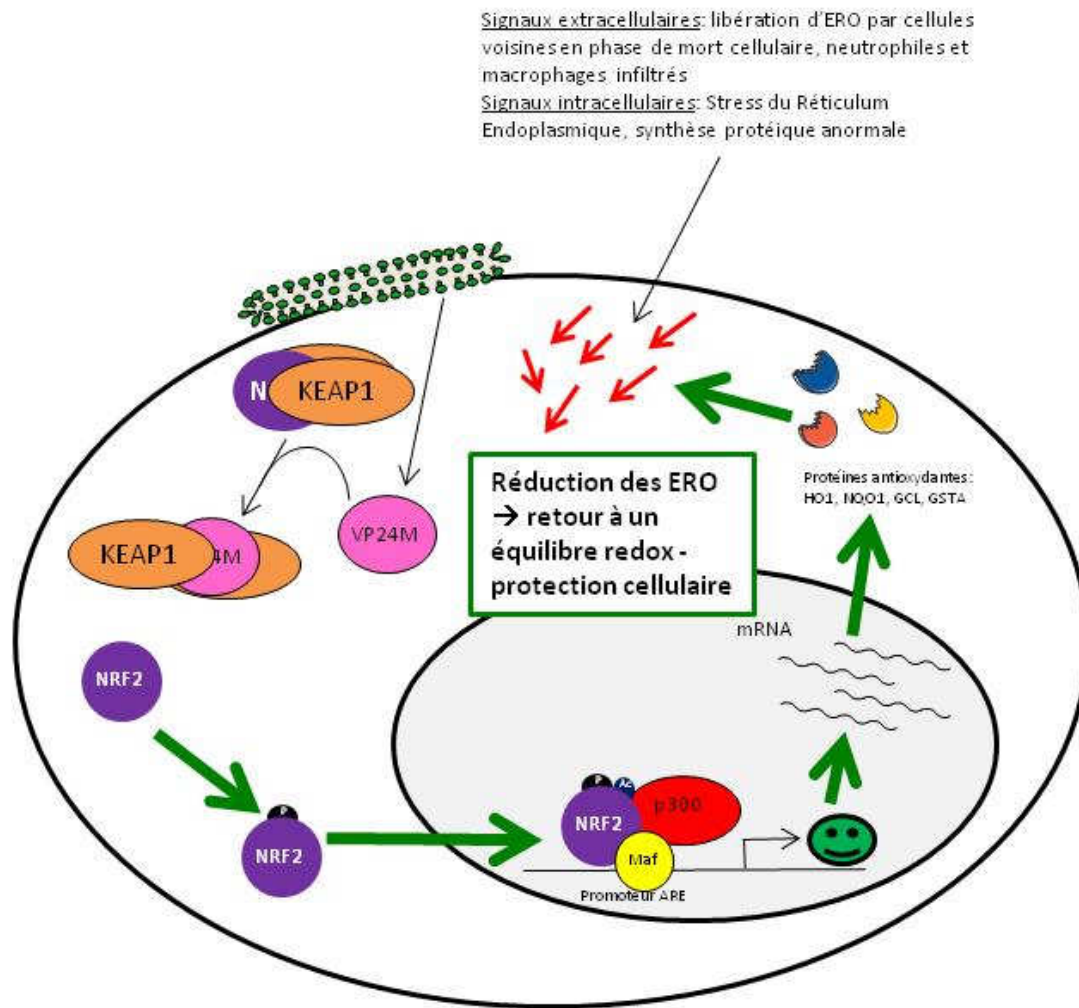


Figure D3 : Modèle de l'activation de Nrf2 par la protéine VP24 du virus de MARV et implications dans le développement de la pathogénicité virale. Dans l'organisme infecté par MARV, de nombreux événements intra- et extra-cellulaires peuvent conduire à l'apparition d'ERO dans les cellules (synthèse massive de protéines et stress du réticulum endoplasmique, réponse immunitaire de l'hôte, mort des cellules avoisinantes). En parallèle, l'infection de cette cellule par MARV conduit à la libération intracellulaire et à la synthèse de la protéine VP24, qui, d'après nos résultats, se liera à Keap1, activant ainsi la voie Nrf2 et la synthèse d'enzymes de réponse au stress oxydatif. Ces protéines pourront réduire les ERO et conduire au retour d'un équilibre d'oxydo-réduction normal, favorisant ainsi la survie des cellules infectées et par conséquent la réplication du virus.

Enfin, les résultats obtenus *in vivo* par nos collaborateurs (Reid et coll, communication personnelle) semblent confirmer cette hypothèse. L'infection par un virus de Marburg adapté à la souris semble moins létale chez des souris qui ne possèdent pas le gène Nrf2 (Nrf2^{-/-}), par rapport au souris qui le possèdent (40% de mortalité des souris Nrf2^{-/-}, contre 100% de mortalité des souris sauvages). L'activation de Nrf2 par la protéine VP24 s'avère donc être très importante dans le développement de la pathologie induite par MARV, probablement car elle permet une meilleure survie des cellules infectées, et donc une augmentation de la virémie, conduisant au développement du syndrome de FH. L'absence de mutations dans le gène de la protéine VP24 entre la forme naturelle et la forme adaptée à la souris de MARV nous permet de présumer que l'action de la VP24 vis-à-vis de la voie de signalisation de Nrf2 sera la même chez les primates, l'homme et chez la souris infectée par le virus adapté. Ainsi, l'ensemble de nos résultats identifie une nouvelle fonction de la protéine VP24 de MARV qui semble être cruciale pour le développement du syndrome de FH à Filovirus.

La découverte du ciblage de la voie de réponse au stress oxydatif au cours de l'infection par MARV pourrait permettre de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques qui viseraient à détruire les cellules infectées en leur empêchant d'activer la voie Nrf2. Par ailleurs, cette étude est la première, à notre connaissance, à mettre en évidence une interaction entre Keap1 et une protéine virale, ce qui pourrait être une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de pathogenèse virale.

La protéine VP24 de MARV serait un régulateur du facteur cellulaire ERRα

Dans la suite de notre travail, nous nous sommes intéressés au devenir d'une autre cible moléculaire de Keap1, le facteur ERRα, en présence de la VP24 de MARV. ERRα est un facteur nucléaire qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans différents processus, dont la survie, le métabolisme, le cycle cellulaire, et les données de nos collaborateurs suggèrent également qu'ERRα gouvernerait un processus de migration cellulaire (Sailland J et Vanacker JM, *Todai Forum*, Lyon, 2011). De plus, le contrôle de l'activité d'ERRα est gouverné par l'induction de sa dégradation protéasomique, via les adaptateurs de CUL3, SPOP et Keap1. Dans ce contexte, il était particulièrement intéressant pour nous d'analyser l'activité de ERRα en présence de la protéine VP24 de MARV, compte tenu de son action sur Keap1 et de la migration des cellules infectées qui est à l'origine de la dispersion du virus dans l'organisme. Afin de tester l'activité d'ERRα, nous avons employé un système de gène rapporteur sous le contrôle du promoteur ERRE (*ERRα Response Element*), la cible de ERRα. Dans un premier temps, nous avons confirmé les résultats de nos collaborateurs en montrant que l'expression de SPOP et, à un moindre niveau, de Keap1, diminuait l'activité de ERRα (Figure R15). Dans cette expérience, nous avons également sur-exprimé KLHL12, une autre protéine se liant à CUL3, mais n'ayant pas d'effet sur ERRα. De façon intéressante, son expression conduit à une franche activation d'ERRα, nous suspectons que cette activation serait liée à une saturation des CUL3 endogènes, qui ne pourraient alors plus exercer leur activité sur ERRα. Les résultats préliminaires que nous obtenons avec un système de gène rapporteur mettent en évidence une forte activation d'ERRα en présence de VP24 (Figure R16), et ceci de façon dose-dépendante, puisque plus on a de VP24 et plus ERRα semble actif. Nous avons suspecté que l'effet activateur de VP24 sur ERRα serait causé par son interaction avec Keap1, comme c'est le cas pour l'activation de Nrf2. Dans ce contexte, nous avons surexprimé des doses croissantes de VP24 en présence de deux doses différentes de

Keap1, 12,5 et 25 ng, ou de SPOP (Figure R17). De même que précédemment, la présence de VP24 induit l'action d'ERR α de façon dose-dépendante. Dans cette expérience, l'activité inhibitrice de Keap1 n'est pas très visible, ceci certainement parce que la dose de Keap1 employée est trop faible (25ng de plasmide pSPORT6-Keap1 au lieu de 50ng dans les autres expériences). De façon surprenante cette levée d'inhibition ne semble pas cibler uniquement le facteur Keap1, puisque l'inhibition d'ERR α par le facteur SPOP est également abolie en présence de VP24. De façon notable, la présence de Keap1 semble faciliter l'induction de l'activation de ERR α par la VP24, puisque les taux d'activité rapportés sont les plus forts lorsque Keap1 et ERR α sont surexprimés, et restent modérés en présence de SPOP. Nous avons alors réalisé une dernière expérience (Figure R18) où nous avons souhaité évaluer l'activation d'ERR α en présence de toutes les molécules impliquées dans son inhibition (CUL3, Keap1, SPOP) ou non (KLHL12) et en présence de VP24. Bien que l'inhibition causée par CUL3 soit difficilement observable dans cette expérience, nous constatons que, quelque soit la stratégie employée, la présence de la protéine VP24 (barres noires) conduit toujours à d'une réactivation d'ERR α . Nous supposons que cette réactivation serait liée à la propriété de la VP24 de se lier à Keap1, qui conduirait non seulement à une réactivation de Nrf2, mais également à une modulation totale de l'activité de CUL3 (**Figure D4** Hypothèse B), par saturation de cette protéine en formant un complexe plus stable qu'avec les substrats endogènes de CUL3. Il est également envisageable d'imaginer que la protéine VP24 pourrait se lier à différents adaptateurs de CUL3, empêchant ainsi le recrutement et la dégradation des protéines cellulaires normalement contrôlées par CUL3 (**Figure D4** Hypothèse A). Dans ce cas, de nombreux facteurs seraient affectés, et des travaux futurs sur l'étude de CUL3 et de ses différents adaptateurs en présence de VP24 permettront conclure sur le mécanisme à l'origine de la réactivation d'ERR α . En outre, une étude de transcriptomique plus approfondie, qui ciblera tous les facteurs de transcription dont l'activité est dépendante de CUL3 permettra de conclure formellement sur ce mécanisme.

Les virus sont à l'origine de stratégies multiples dans le but de contourner la réponse cellulaire, pour survivre et se répliquer sans un environnement qui sera plus bénéfique pour la production de virions. Dans ce but, il a été clairement établi que le protéasome et la machinerie cellulaire d'ubiquitination peuvent être des cibles virales, et en particulier, les virus peuvent induire l'ubiquitination de leurs propres protéines. C'est le cas par exemple du virus Ectromelia [428], du Papillomavirus[429], du virus Ebola[430] et des Poxvirus [431]. D'un autre côté, l'induction de la dégradation de certains composants cellulaires par le virus peut conduire au contournement d'une voie cellulaire (pour revue, voir [432]). Dans les deux premières parties de cette thèse, un ciblage d'une voie faisant intervenir CUL3 est démontré. Nous pouvons donc supposer que la VP24 ciblerait spécifiquement CUL3 pour permettre la mise en place d'un évènement non identifié à l'heure actuelle mais qui serait crucial pour la réplication de MARV, comme par exemple l'ubiquitination d'une protéine virale. Ce détournement de l'activité de CUL3 serait causé par le ciblage des adaptateurs de CUL3 par la VP24. Ce mécanisme est clairement démontré pour Keap1, et il serait intéressant de l'étudier pour les autres adaptateurs, tels que SPOP.

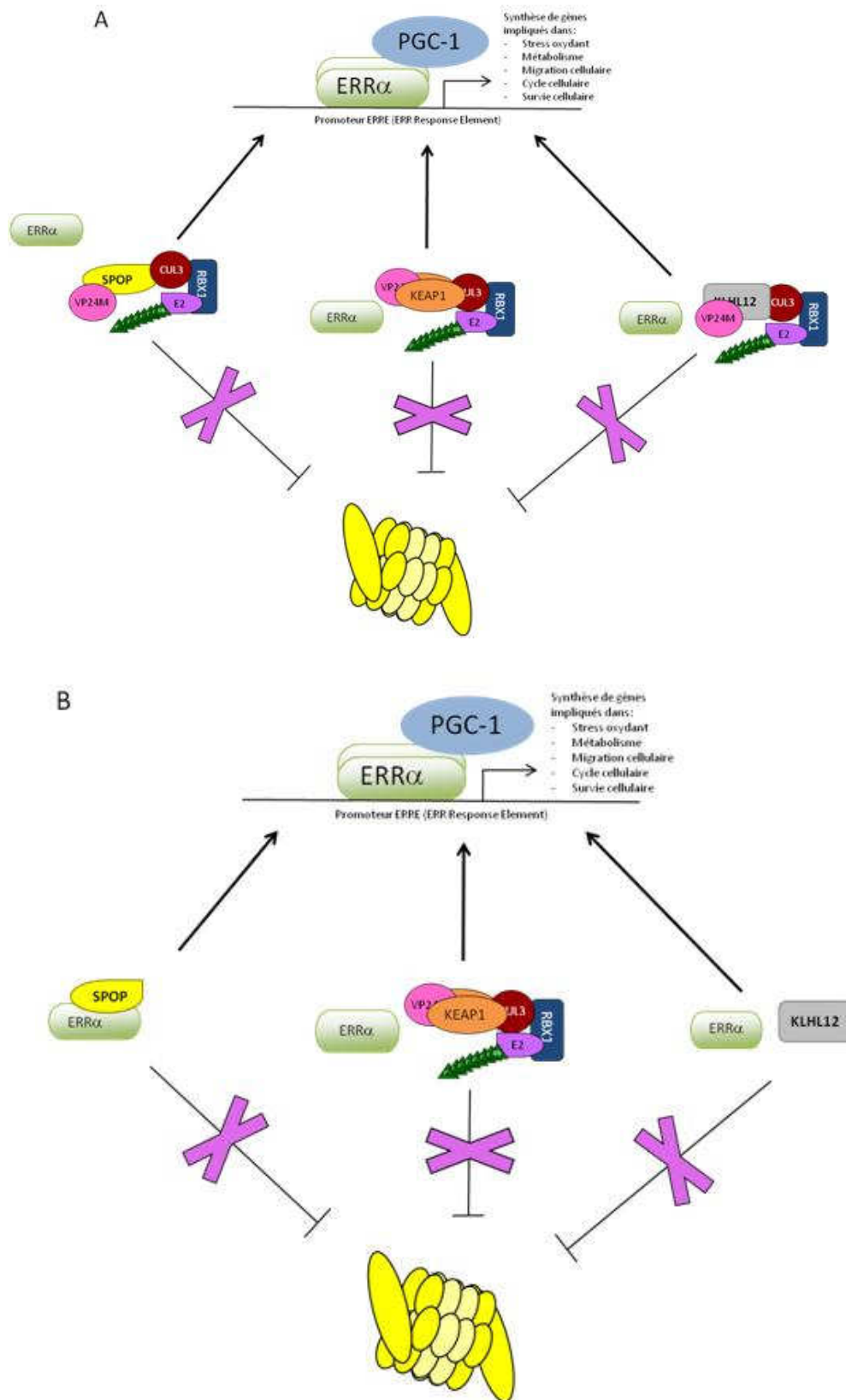


Figure D4 : Hypothèses expliquant la restauration de l'activité transcriptionnelle de ERRα en présence de VP24 MARV. (A) : La protéine VP24 ciblerait toutes les protéines jouant le rôle d'adaptateurs de CUL3, résultant en un blocage de la dégradation d'ERRα et de toutes les protéines dont la dégradation est conditionnée par ces adaptateurs. Par conséquent, ERRα serait accumulé dans les cellules, et donc activé. (B) : La protéine VP24, en se liant à Keap1, induirait un titrage des E3-Ubiquitine-ligases, qui ne seraient donc plus liées aux autres adaptateurs, tels que SPOP et CUL3, ce qui empêcherait la dégradation d'ERRα, induirait son accumulation cellulaire et donc son activation.

Le facteur $ERR\alpha$ est impliqué dans la survie, la division [415] et la migration cellulaire. Il serait donc intéressant de savoir si l'activation de ce facteur par la VP24 permet aux cellules infectées par MARV de mieux survivre que les cellules non-infectées, ou s'il favorise la dispersion du virus à l'échelle de l'organisme.

Si l'activation d' $ERR\alpha$ est confirmée lors de l'infection virale, pour la deuxième fois un facteur favorisant la survie cellulaire serait activé par la VP24, ce qui confirmerait le rôle de cette protéine virale en tant qu'agent cytoprotecteur favorisant la survie et la propagation des cellules infectées par MARV. Le blocage de cette activité protectrice de la VP24 serait donc une approche thérapeutique intéressante et prometteuse dans le but de bloquer la dispersion de MARV dans l'organisme. En effet, nous pourrions supposer qu'en empêchant l'interaction entre Keap1 et la VP24, et éventuellement en empêchant également le mécanisme moléculaire à l'origine de l'activation de $ERR\alpha$, nous pourrions restaurer une activité normale des cellules infectées, et inhiber l'activation des facteurs Nrf2 et $ERR\alpha$ qui sont impliqués dans la survie des cellules. En conséquence, les cellules infectées pourraient mourir précocement, empêchant ainsi la réplication du virus et sa dissémination dans l'organisme.

La protéine VP24 du virus Ebola est un inhibiteur de la réponse au stress oxydatif cellulaire médiée par Nrf2.

Compte tenu des similitudes de pathogenèse entre les virus EBOV et MARV, nous avons ensuite souhaité évaluer le devenir de la voie Nrf2 au cours de l'infection par EBOV. De façon très surprenante, nous avons montré que le virus EBOV inhibe l'activité de Nrf2 dans le cadre de l'infection virale, comme en témoigne la diminution d'expression relative de NQO1 au cours de l'infection (Figure R19). Dans la mesure où pour le virus de MARV, c'est la protéine VP24 qui est impliquée dans la modulation de la voie Keap1/Nrf2, nous avons ensuite supposé que la protéine VP24 d'EBOV était à l'origine de cette modulation. Nous avons donc étudié l'activation du plasmide pHHO1-Luciférase et la production de NQO1 en conditions de transfection de la VP24 (Figure R20). L'expression de NQO1 est inhibée par la présence de VP24 d'EBOV et ceci dès le premier jour après la transfection, contrairement à ce qui a été observé lors de l'infection, où l'inhibition était beaucoup plus visible le deuxième mais surtout le troisième jour après l'infection (Figure R19). En effet, la surexpression de Nrf2 est très puissante pour l'activation de sa fonction transcriptionnelle, et le blocage de cette activité dans les conditions d'infection nécessite plus de temps pour permettre d'avoir un taux d'expression de la VP24 satisfaisant pour cette activité, tandis que dans les conditions de transfection, la synthèse de VP24 est massive et induit un blocage dès 24h d'expression. Cette différence entre les conditions d'infection et de transfection, couplée à la mise en évidence d'une activité dose-dépendante de la VP24 dans le test luciférase indique qu'il est nécessaire d'avoir un taux relativement élevé de protéine virale VP24 pour observer le blocage de Nrf2.

Nous avons ensuite employé un plasmide codant pour Nrf2 fusionné à une protéine GFP, afin d'étudier le devenir intracellulaire de ce facteur de transcription en présence de la protéine VP24 (Figure R21). Dans des conditions de traitement avec tBHQ, Nrf2 se relocalise au niveau nucléaire pour être actif. Nos résultats indiquent par contre qu'en présence de VP24, Nrf2 est séquestré dans des agrégats périnucléaires formés par la VP24, et le traitement par tBHQ ne semble pas modifier cette localisation, ce qui explique donc l'inactivité de Nrf2 que nous avons observée dans les expériences précédentes. Ce résultat nous a conduits à suspecter une interaction directe entre Nrf2

et la VP24 d'EBOV, et l'expérience d'immunoprécipitation que nous avons réalisée infirme l'hypothèse d'une interaction directe entre ces deux protéines (Figure R22).

Dans la mesure où la protéine VP24 du virus de Marburg se lie à Keap1, nous avons testé l'interaction entre Keap1 et la VP24 d'EBOV. Ces deux protéines ne semblent pas interagir en immunoprécipitation (Figure R23). Ce résultat biochimique semble confirmer l'expérience d'Immunofluorescence où la coexpression de la VP24 d'EBOV avec Keap1 n'induisait pas de changement dans la distribution de ces protéines. Pris ensemble, ces résultats montrent que l'inhibition de l'activité de Nrf2 par la protéine VP24 d'EBOV n'est pas directement reliée à Keap1.

La voie de signalisation de Nrf2 est contrôlée par de nombreuses étapes régulatrices, dont notamment les modifications post-traductionnelles de Nrf2 (ubiquitination, phosphorylation, acétylation) et son import nucléaire. La dissection de ces étapes permettra d'identifier le mécanisme moléculaire gouverné par VP24 qui conduit au blocage de l'activité de Nrf2. Les expériences réalisées au laboratoire mettent en avant une inhibition de l'acétylation de Nrf2 en présence de VP24, ce qui pourrait expliquer le blocage de son activité. Toutefois, les raisons de l'arrêt de l'acétylation ne sont pas encore connues. Le mécanisme de l'acétylation de Nrf2 se produit au niveau nucléaire[368], c'est-à-dire après l'import nucléaire. Nos résultats d'immunofluorescence indiquent une accumulation cytoplasmique de Nrf2 en présence de la VP24, malgré l'activation de sa translocation nucléaire par un traitement avec tBHQ, mettant en évidence un possible blocage de l'import nucléaire de Nrf2. Compte-tenu du fait que la Karyophérine alpha 1 est un partenaire de la VP24 d'EBOV[95], et qu'elle est responsable de l'import nucléaire de Nrf2 [362], il a été intéressant d'analyser le devenir de l'interaction entre KPNA1 et Nrf2 en présence de VP24. De façon surprenante, les résultats préliminaires obtenus suggèrent que la liaison entre Nrf2 et les Karyophérines ne serait pas affectée par la présence de la protéine VP24. Toutefois, ces résultats n'ont pas été réalisés en présence d'une molécule induisant la translocation nucléaire de Nrf2. Il semble donc nécessaire d'analyser les conséquences de la présence de la protéine VP24 d'EBOV sur l'interaction Nrf2-Karyophérine en présence de tBHQ ou de Sulforaphane (une autre molécule induisant la translocation nucléaire de Nrf2), afin d'évaluer de façon plus précise l'impact de la VP24 sur cette interaction. De plus, il a été récemment montré que la protéine Keap1 était importée dans le noyau cellulaire *via* la Karyophérine alpha 6 (KPNA6)[377], une autre KPNA qui lie également la protéine VP24. Il serait donc intéressant d'analyser le devenir du complexe KPNA6-Keap1-Nrf2 en présence de la VP24 d'EBOV.

Nos résultats ont mis en évidence une accumulation de la protéine Nrf2 dans le cas d'infection par EBOV ou de transfection par VP24 (Figure R19 et R20). Ce résultat était inattendu, dans la mesure où Nrf2 est inactivé par la présence de VP24, et où son inactivation est strictement reliée à l'induction de sa dégradation protéasomique par Keap1 [339] et CRIF1 [381]. Ce résultat va à l'encontre du modèle communément accepté où la stabilisation du facteur Nrf2 induit son activation. La régulation dépendante de CRIF1, principalement nucléaire [381], serait partiellement abolie dans notre étude, en raison de l'accumulation cytoplasmique de Nrf2 que nous retrouvons en présence de VP24 (voir Immunofluorescence). En outre, le blocage de la synthèse des enzymes anti-oxydantes par la VP24 résulte certainement en une augmentation des ERO intracellulaires, qui vont alors aller se fixer sur les protéines présentes, et notamment les résidus cystéines de Keap1 qui y sont hautement sensibles [349]. Finalement, l'activité de Keap1 serait inhibée, résultant en la libération de Nrf2, qui ne pourra plus être ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Il en résultera une accumulation intracellulaire

de Nrf2, qui en raison de son blocage par la VP24, restera inactif dans les cellules (voir **Figure D5**). Une étude plus poussée de l'état d'oxydation de Keap1 et de l'ubiquitination de Nrf2 en présence de la protéine VP24 d'EBOV permettra sans doute de confirmer ce modèle d'explication de l'accumulation intracellulaire de Nrf2 en présence de VP24.

Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons établi une liste de partenaires potentiels de la protéine VP24 du virus Ebola, dans l'idée de mieux comprendre le phénomène à l'origine du blocage de l'activité de Nrf2 par cette protéine virale. De façon attendue, nous avons identifié les Karyophérines alpha 1, 5, et 6, comme partenaires de la VP24, conformément à la littérature [95, 96]. En outre, nous identifions une série de protéines associées au cytosquelette (voir tableau R2 et R3). En particulier, la DYNLLC8 a été identifiée, et cette protéine est connue pour se lier à la protéine VP35 d'EBOV [433]. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la mesure où les protéines VP24 et VP35 d'EBOV sont toutes les deux impliquées dans l'assemblage des RNP virales [142]. Cette découverte suggère que la formation des RNP pourrait être conditionnée par la capacité des VP24 et VP35 à interagir avec le cytosquelette cellulaire. L'analyse future de la DYNLLC8 et de sa capacité à interagir avec la VP24 et avec la VP35 permettra certainement de conclure quand à son rôle au cours du cycle viral. Enfin, le partenaire cellulaire le plus fréquemment identifié dans notre crible, à l'exception des Karyophérines, est la protéine SPIN90, une molécule importante pour la formation des Filopodes et pour la déformation des membranes plasmiques cellulaires [434]. Nous avons confirmé la capacité de cette protéine à lier la VP24 d'Ebola en employant une technique d'immunoprécipitation (Figure R24). De plus, ces protéines colocalisent fortement et semblent s'associer au niveau de la membrane cellulaire. Cette colocalisation pourrait jouer un rôle important dans la formation des Filopodes qui a été rapportée lors du bourgeonnement des virions aux étapes tardives du cycle réplcatif viral [189].

Dans cette partie de notre travail, nous identifions une inhibition VP24-dépendante de l'activité du facteur de transcription Nrf2 au cours de l'infection par EBOV. Les expériences réalisées au niveau moléculaire ne nous ont par permis de mettre en évidence un mécanisme précis pour cette inhibition. Toutefois, nos résultats indiquent une forte accumulation cytoplasmique de Nrf2 en présence de VP24, ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression de Nrf2 en présence de VP24, suggérant l'implication de l'interaction entre la VP24 et les Karyophérines pour empêcher l'action de Nrf2.

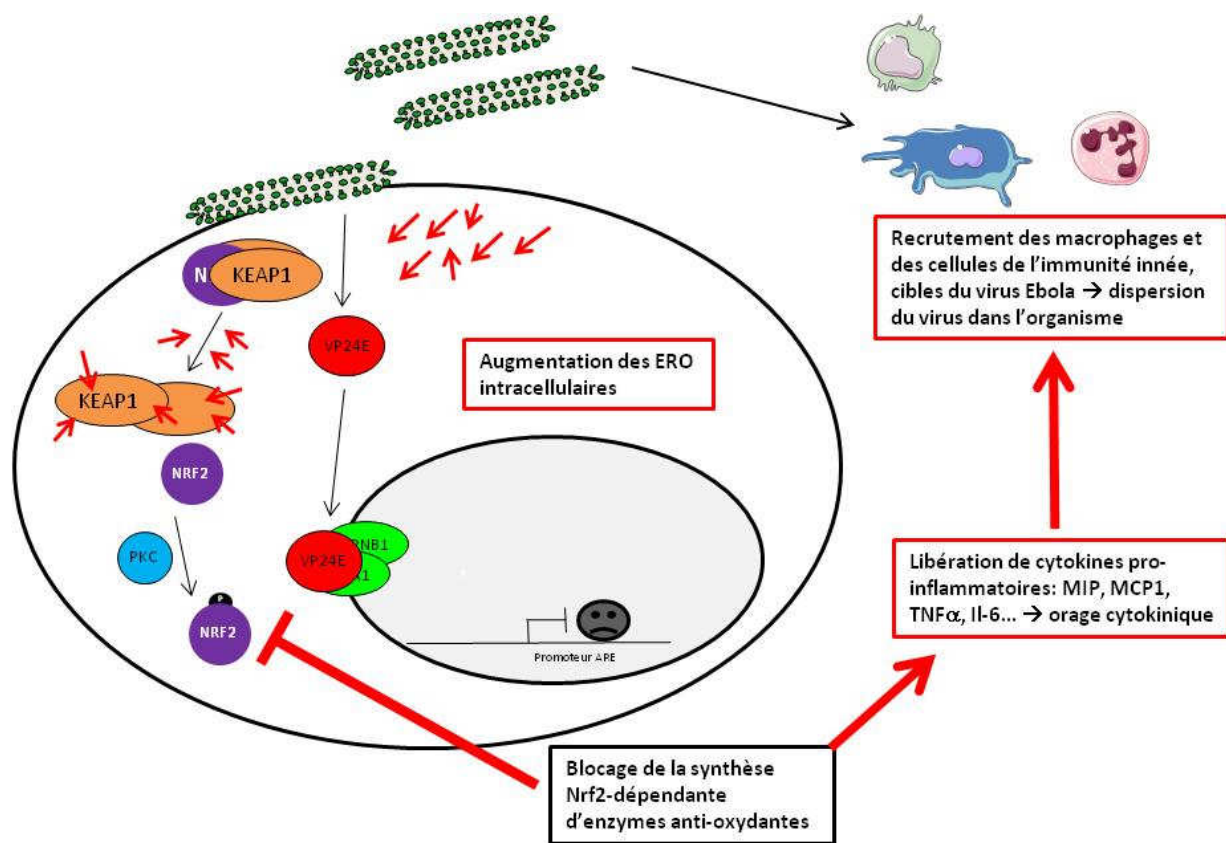


Figure D5 : Modèle moléculaire de l'inhibition du facteur Nrf2 par la protéine VP24 d'EBOV. Lors de l'infection par EBOV, la protéine VP24 est synthétisée et va se lier aux Karyophérines, empêchant la translocation nucléaire des facteurs de transcription, dont potentiellement Nrf2. Il en résulte une diminution de l'acétylation de Nrf2, et de son activité inductrice de la synthèse d'enzymes anti-oxydantes. Ceci empêchera la réduction des ERO, qui vont alors s'accumuler dans la cellule, et se fixer aux protéines cellulaires dont Keap1, bloquant la dégradation protéasomique de Nrf2, qui s'accumule en présence de VP24. De plus, la diminution de la synthèse d'HO-1 et NQO1 résultera en une diminution du contrôle de la réponse inflammatoire, et donc en l'augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à un recrutement massif des cellules de l'immunité innée, qui seront à leur tour infectées par le virus pour induire sa dispersion dans l'organisme.

L'inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur Nrf2 par la VP24 d'EBOV pourrait jouer un rôle important dans le développement de la très haute pathogénicité des infections à Ebola. Bien que non expliquée à l'heure actuelle, le caractère hautement pathologique d'EBOV semble résider dans la dérégulation complète de la réponse immunitaire de l'hôte, qui conduira à un orage cytokinique important, avec l'induction de facteurs pro-inflammatoires. Ce mécanisme reste mal compris. En effet, en parallèle de cette induction, les macrophages et les cellules dendritiques, cibles primaires de l'infection, sont incapables d'activer la réponse adaptative cellulaire, et une apoptose massive des lymphocytes a été rapportée. Il semble donc que l'infection de ces cellules présentatrices de l'Antigène bloque leur fonction principale, mais permette pourtant la libération extracellulaire de cytokines pro-inflammatoires (MCP1, MIP1, IL6, IFN γ ...). En outre, la voie Interféron est aussi bloquée par les protéines VP35 et VP24.

De nombreuses études ont révélé une implication du facteur Nrf2 dans la régulation de la réponse pro-inflammatoire, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Notamment, l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial s'avère beaucoup plus pathogène chez des souris Nrf2^{-/-} que chez des souris sauvages, et en particulier la génération de cytokines pro-inflammatoires dans les poumons semble exacerbée par l'absence de Nrf2 [382]. Ce résultat confirme d'autres études où des souris Nrf2^{-/-} semblent mettre en place une réponse pro-inflammatoire exagérée avec notamment une synthèse importante d'IL-6, d'interféron, de MCP1, de TNF α , etc.[382, 435-437]. Finalement Nrf2 semble jouer un rôle immuno-modulateur fondamental pour permettre d'éviter les dommages liés à une trop importante réponse pro-inflammatoire, et son activation semble être une approche thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies inflammatoires [438].

Dans une autre étude, l'activation de la protéine HO-1 par le monoxyde d'azote s'est révélée dépendante de Nrf2 [439], et cette activation semble importante pour permettre la survie des cellules vasculaires. Lors de l'infection par Ebola, de fortes quantités de NO sont mesurées dans le sang, ce qui devrait conduire à l'activation de Nrf2, pour favoriser la survie des cellules et le maintien de l'intégrité vasculaire. Toutefois, nous montrons ici que la protéine VP24 d'EBOV empêche cette activation, et donc conduirait potentiellement à la perte l'intégrité de l'épithélium vasculaire, à l'origine du syndrome hémorragique.

Le blocage de Nrf2 par la protéine VP24 du virus Ebola semble donc avoir des conséquences importantes sur le développement de la pathogénicité virale. Les études futures, identifiant le mécanisme moléculaire responsable de cette inhibition, et le domaine de la protéine VP24 concernée permettront certainement de mettre au point un virus recombinant dont l'action sur Nrf2 sera empêchée, et dont le caractère pathologique pourra être étudié chez l'animal.

Dans ce travail de thèse, nous identifions pour la première fois (i) une fonction de la protéine VP24 de MARV, (ii) un effet antagoniste des protéines VP24 des Filovirus, et (iii) une modulation VP24-dépendante de l'activité du facteur de transcription Nrf2 lors de l'infection par les Filovirus. Nos résultats d'expériences d'infection ont confirmé les effets antagonistes des VP24 de MARV et d'EBOV sur la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire médiée par Nrf2 : alors que MARV semble activer Nrf2, EBOV semble l'inhiber. Ce résultat met en avant pour la première fois une divergence fonctionnelle entre ces deux virus, appartenant pourtant à la même famille. Chez l'homme et les primates, ainsi que dans les modèles de virus hautement pathogènes chez les rongeurs, ces deux

virus sont à l'origine de la même maladie, à savoir une fièvre hémorragique virale fulgurante avec une issue souvent fatale. Alors, comment peut-on expliquer des similitudes dans la pathogenèse virale, alors qu'au niveau moléculaire, des mécanismes antagonistes sont identifiés ?

Une clé de la réponse à cette question semble se retrouver dans les caractéristiques intrinsèques de chacun de ces virus, dont la réplication semble légèrement différente. L'analyse de la réplication de ces deux virus *in vitro* a mis en évidence que MARV se réplique plus lentement qu'EBOV [440]. En outre, les expériences d'infection réalisées chez l'animal, ainsi que les données cliniques sur le développement de la pathologie indiquent que MARV serait plus lent pour sa réplication qu'EBOV. Ainsi, MARV serait à la fois moins toxique pour les cellules, mais surtout il représenterait une cible plus facile pour le système immunitaire de l'hôte, et les cellules infectées pourraient être affectées par l'infiltration des cellules phagocytaires et la libération des ERO. En ce sens, l'activation du facteur Nrf2, et en particulier l'extension de la durée de vie de la cellule infectée lui permettrait de mieux se répliquer, et la mise en place de cette « niche » protectrice conférée par l'activation de Nrf2 que nous montrons dans ce travail semble aller en ce sens. Par contre, pour le virus EBOV, tout semble se passer beaucoup plus vite, comme en témoignent notamment l'apparition rapide d'effets cytopathiques dans les cellules infectées (qui est beaucoup moins évident pour les cellules infectées par MARV). Alors, nul besoin dans ce cas pour le virus de tenter de protéger la cellule qu'il infecte, sa réplication sera assez rapide et fulgurante pour lui permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte sans déployer de mécanisme cyto-protecteur.

Dans cette étude nous supposons que l'inhibition de Nrf2 serait importante pour le développement de la pathogenèse virale dans le cas des infections à EBOV, notamment qu'elle jouerait un rôle important dans la libération massive des cytokines pro-inflammatoires observée chez les patients infectés par EBOV. Des études complémentaires où le facteur Nrf2 sera activé préalablement à l'infection, notamment par administration d'un traitement antioxydant chez des animaux, permettront de conclure quant à l'importance de cette découverte pour la compréhension de la pathogenèse lors de l'infection par Ebola. S'il s'avère concluant, ce traitement à base d'antioxydant pourrait même être testé comme traitement antiviral.

Les données concernant les infections par MARV mettent en évidence la libération des mêmes facteurs pro-inflammatoires que lors d'infection à EBOV. Il semble donc que lors de l'infection à MARV, il existe un autre mécanisme, indépendant du facteur Nrf2, qui résulterait en l'induction de cytokines pro-inflammatoires.

Conclusion générale et perspectives

Pour conclure, dans ce travail de thèse,

- Une liste de partenaires potentiels de la protéine VP24 de MARV a été obtenue par une technique de crible double hybride en levures, et en particulier la protéine Keap1 a été identifiée. L'interaction entre Keap1 et la protéine VP24 a ensuite été confirmée en cellules de mammifères.
- La cartographie des résidus de Keap1 impliqués dans la liaison à la VP24 a révélé un ciblage du domaine Kelch de Keap1 par la VP24, domaine impliqué dans l'inhibition Keap1-dépendante du facteur de transcription Nrf2. Les tests fonctionnels que nous avons réalisés ont mis en évidence une activation spécifique de Nrf2 en présence de MARV VP24, en transfection et en infection. MARV induit donc l'activation de la voie de réponse au stress oxydatif cellulaire, et nous suspectons que cette action favoriserait la survie des cellules infectées dans un environnement chargé de molécules toxiques.
- Une fois cette fonction de la VP24 de MARV découverte, nous nous sommes intéressés au devenir de la voie de signalisation médiée par Nrf2 lors de l'infection par EBOV. De façon surprenante, nos résultats ont révélé une inhibition de cette voie, contrairement à ce qui avait été observé lors de l'infection par MARV. Nous avons ensuite montré que la protéine VP24 d'EBOV était à l'origine de cette inhibition, mais le processus faisant intervenir la VP24 dans le blocage de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 reste incompris : bien que l'expression de la protéine VP24 conduise à une accumulation cytoplasmique de Nrf2, il n'existe pas d'interaction entre Keap1 et la VP24 d'EBOV, ni entre Nrf2 et cette dernière. Les travaux futurs permettront de mettre en lumière le mécanisme d'action de la VP24 de EBOV sur cette voie.

Ce travail identifie une nouvelle modulation de l'activité transcriptionnelle cellulaire par les VP24, qui vient s'ajouter au blocage des facteurs de transcription STAT qui avait été découvert par le passé. Dans le futur, une analyse de transcriptomique pourrait permettre d'avoir une vision globale de la modulation de l'activité de tous les facteurs de transcription cellulaires par les protéines VP24 des Filovirus. De plus, La mise au point par génétique inverse de virus qui auront perdu leur capacité à moduler l'activité de Nrf2, l'étude de leurs propriétés répliquatives, et de la pathogenèse dans un modèle animal permettront de mieux comprendre le rôle de la modulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif par les VP24.

Compte-tenu de leur capacité à permettre la réplication des Filovirus sans développer de syndrome de FH, les chauves-souris sont considérées comme le réservoir des Filovirus. Il serait donc intéressant d'évaluer la modulation de la réponse au stress oxydant par les protéines VP24 chez ces animaux résistants à l'infection.

La découverte de l'interaction entre la VP24 d'EBOV et la protéine cellulaire SPIN90 suggère un nouveau mécanisme pour les déformations membranaires de la cellule lors du bourgeonnement et un ciblage du cytosquelette d'actine au cours du cycle répliquatif. L'approfondissement de cette étude permettra certainement de confirmer ces hypothèses en étudiant en détails les mouvements du

cytosquelette en présence de VP24. Empêcher l'interaction VP24-cytosquelette pourrait ainsi conduire au blocage du cycle réplcatif des Filovirus, et s'avérerait donc être une approche thérapeutique intéressante.

Ainsi ce travail apporte un nouvel éclairage dans la compréhension du rôle des protéines VP24 dans la très haute pathogénicité des infections à Filovirus. De plus, en regard des données précédemment obtenues pour les protéines VP24 de MARV [205] et d'EBOV [95-97, 207, 209, 411, 441], notre travail confirme la pluri-fonctionnalité des protéines VP24 lors de l'infection par les Filovirus. Cette pluri-fonctionnalité fait de ces protéines des clés de la compréhension du mécanisme de la pathogénèse virale.

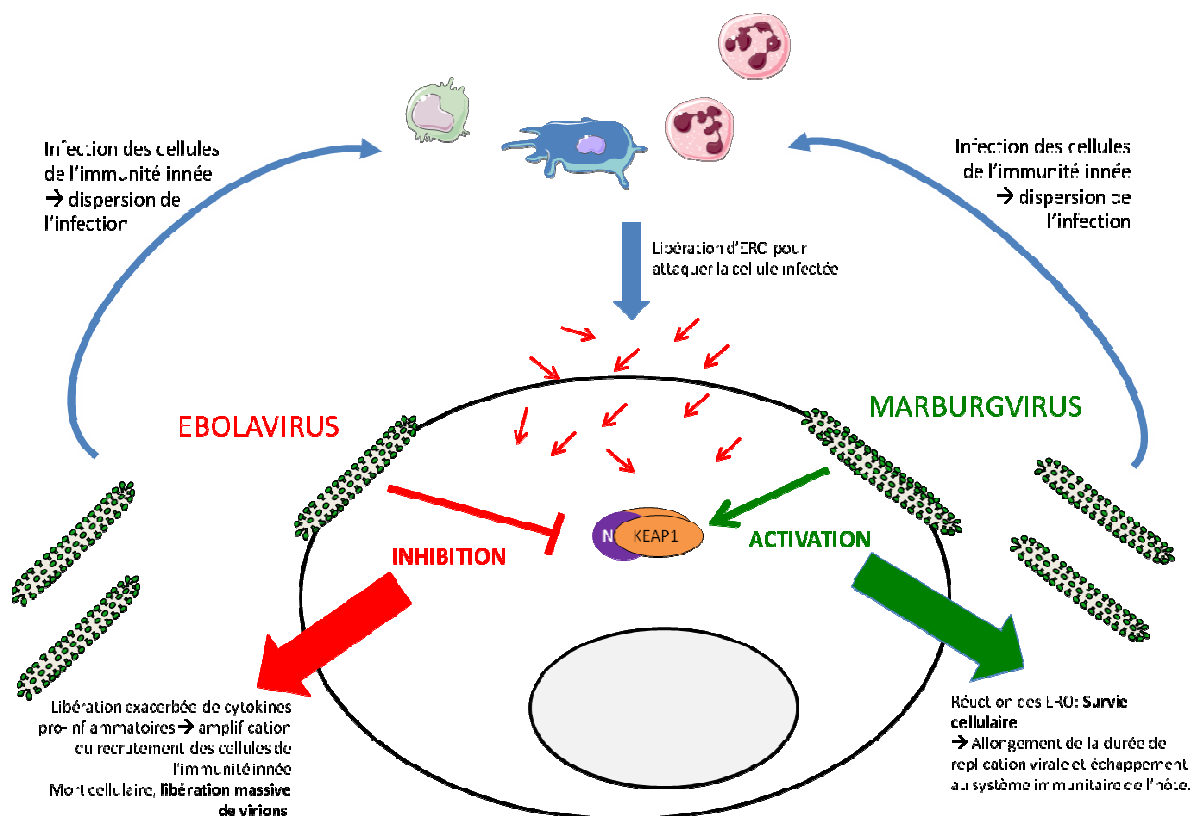


FIGURE C1 : Les virus Ebola et Marburg exercent des fonctions opposées sur la réponse cellulaire au stress oxydatif.

Enfin, ce travail montre que les virus Ebola et Marburg, bien qu'appartenant à la même famille virale et étant tous deux responsables d'un syndrome de FH chez l'homme et les primates, exercent une fonction opposée sur la voie Nrf2 (voir **Figure C1**), alors même que ce facteur cellulaire semble très important dans le contrôle de la pathogénèse pour d'autres virus. Cette découverte majeure suggère que les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogénicité d'EBOV et MARV pourraient être différents, ce qui n'avait pas été suggéré jusqu'ici.

Matériels et Méthodes

Cellules

Des cellules 293T (cellules embryonnaire de rein humain), Vero (cellules épithéliales de rein de singe) et Hela (cellules humaines dérivées d'un carcinome du col de l'utérus) ont été obtenues de l'ATCC et cultivées en DMEM (Dulbecco Modified Eagles Medium), complémenté par 10% de Sérum de Veau Fœtal, Penicilline (100U/ml), Streptomycine (100µg/ml) et Glutamine. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂, et passées tous les 3 jours.

Virus

Le virus de Marburg a été obtenu par mise en culture de la souche naturelle de Marburg Musoke (Numéro d'accension Genbank : DQ217792) sur cellules Vero. Le virus Ebola a été obtenu en utilisant le système de génétique inverse développé au laboratoire [78], à partir du génome du virus Ebola Zaïre Mayinga (Numéro d'accension Genbank : AF086833). Le virus obtenu par ce protocole a ensuite été amplifié dans des cellules Vero. Pour les deux virus, le surnageant fut collecté, clarifié et congelé. Le titre infectieux a été déterminé sur un aliquot de la production par détermination de la Dose Infectieuse en Culture de Tissu (TCID₅₀) sur des cellules Vero. Toutes les expériences impliquant l'utilisation de virus ont été réalisées dans le laboratoire de Haute Sécurité P4 Jean Mérieux de Lyon.

Plasmides

Le plasmide pHCMV codant pour la protéine VP24 de MARV, flanquée d'une étiquette peptidique (myc ou HA) ou non, fut obtenu en clonant la séquence de la protéine VP24 de Marburg Musoke aux sites de restriction EcoRI du plasmide. Le même protocole a été employé pour l'obtention du plasmide pHCMV-VP24Z (codant pour la VP24 d'EBOV zaïre) et pour la VP24Z-myc. Le plasmide pSPORT6 de Keap1 fut obtenu des laboratoires Biovalley et utilisé tel quel. Alternativement, le gène codant pour Keap1 fut sous-cloné dans le plasmide pDEST-myc en employant la stratégie Gateway, (Invitrogen) afin d'ajouter le peptide myc à l'extrémité amino-terminale de la protéine. Le plasmide pDEST-myc-Keap1 fut alors employé pour générer des mutants de délétions par introduction de codons STOP par mutagenèse dirigée. De même, les mutants de substitutions de Keap1 furent obtenus par introduction de substitutions dans la séquence codante par mutagenèse dirigée.

Un plasmide contenant la séquence entière de l'ADNc de SPIN90 a été obtenu de Biovalley. La séquence codante de SPIN90 a ensuite été sous-clonée dans un pHCMV avec addition d'un épitope Flag à l'extrémité amino-terminale du gène de SPIN90, dans le but de générer une protéine recombinante.

Les plasmides pHCMV-Nrf2 et pHHO1-Luciférase nous ont été fournis gracieusement par le Professeur Al Cederbaum (Mount Sinai School of Medicine, New York). Le plasmide pRLTK nous a été fourni par le Dr Christopher Basler (Mount Sinai School of Medicine, New York)

Les plasmides pGL3-ErrEtk-Luciférase, pSG5-ERRalpha-Flag, pcDNA3-SPOP-HA, pcDNA-KLHL12, pHMCV-CUL3 nous ont été fournis gracieusement par le Dr Jean Marc Vanacker de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon.

Le plasmide pEGFP-C2 et pEGFP-Nrf2 nous ont été gracieusement fournis par le Dr Ifeanyi Arinze from Meharry Medical College, Nashville, Tennessee.

Anticorps et produits chimiques

3-amino-1,2,4-triazole (3AT), tBHQ (tert-Butyl Hydroquinone) et SFN (Sulforaphane) ont été obtenus de SIGMA ALDRICH.

Les sérums ployclonaux de lapin dirigés contre les protéines VP24 d'EBOV et de MARV ont été produits au laboratoire. Les Anticorps anti-Keap1 (sc-15244), anti-Nrf2 (sc-722), anti-NQO1 (sc-32793) viennent de Santa Cruz. L'anticorps dirigé contre l'épitope myc a été obtenu de Zymed, alors que les anticorps dirigés contre les épitopes HA et FLAG ont été obtenus de Sigma Aldrich. Les anticorps secondaires utilisés en western blot et couplés à la Peroxidase (HRP, Horse Radish Peroxidase) proviennent de Dako. Les anticorps Alexa Fluor utilisés en Immunofluorescence indirecte ont été achetés chez Invitrogen.

Crible double hybride en levures

La technique du crible double hybride en levures que nous avons utilisée a été décrite par ailleurs [442]. Brièvement, les gènes codant pour les VP24 de MARV, d'EBOV (espèce zaïre et reston), ainsi que l'extrémité amino-terminale de la VP24 d'EBOV zaïre (résidus 1 à 212) ont été clonés dans le plasmide accepteur pPC97 (Gateway) qui permet l'expression d'une protéine recombinante possédant le domaine de liaison au promoteur Gal4 (Gal4 BD). Ce plasmide a ensuite été introduit dans des levures de l'espèce AH109 par transformation en utilisant le protocole Lithium/Acétate. Les levures recombinantes obtenues, sélectionnées sur milieu sélectif, ont alors été criblées contre des levures de type Y187, qui avaient été préalablement transformées par le vecteur pPC86 (Gateway) contenant un ADNc provenant d'une banque d'ADNc de rate humaine. Le vecteur pPC86 permet l'expression du gène d'intérêt en une protéine recombinante fusionnée au peptide Gal4AD (Domaine Activateur du promoteur Gal4). Les cribles ont été cultivés sur milieu synthétique contenant du 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) et sans histidine pour 6 jours, puis transférés sur du milieu sélectif frais tous les 2 jours pendant 3 semaines, dans le but d'éliminer les faux positifs. Une PCR a ensuite été réalisée sur les colonies de levure traitées à la Zymolase, en utilisant des amorces qui s'hybrident au niveau de pPC86. Les produits de PCR ainsi obtenus ont été séquencés, et les séquences ont été analysées par BLAST pour identifier les interacteurs humains. En parallèle, le nombre de levures diploïdes (ie, le nombre de levures portant les deux plasmides) généré pour chaque crible fut déterminé par mise en culture de dilutions du produit de crible sur du milieu sélectif, sans tryptophane et sans leucine.

Transfection transitoire

Les cellules 293T et Hela sub-confluentes ont été transfectées en utilisant de l'Exgen (Euromedex). Les plasmides ont été dilués dans du DMEM sans sérum, vortexés, et l'Exgen a été ajouté à un ratio de 1 : 4 (μg d'ADN : μl d'Exgen). Les réactions de transfection ainsi préparées ont ensuite été vortexées et incubées 15 min à température ambiante. Le milieu de culture cellulaire a alors été retiré et remplacé par les réactions de transfection, mis à incuber 2h à 37°C avant d'ajouter un volume équivalent au triple du volume final de la réaction de transfection de DMEM avec 10% de

SVF. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture pour la durée indiquée dans chaque expérience.

Les cellules Vero ont été transfectées avec du FuGene HD (Roche Diagnostics). Les cellules ont été préparées en absence d'antibiotiques, et les plasmides ont été dilués dans du DMEM sans sérum et sans antibiotique. Les réactions de transfection ont été vortexées puis le Fugene HD a été ajouté à un ratio de 1:5 (μg d'ADN : μl de Fugene HD). Les réactions de transfection ont été vortexées puis incubées 10 min à température ambiante, avant d'être ajoutées directement sur les cellules dans leur milieu de croissance (contenant 10% de SVF, sans antibiotique). Les cellules ont ensuite été maintenues en culture pour la durée indiquée dans chaque expérience.

Immunoprécipitation

Immunoprécipitation contre l'épitope myc

L'immunoprécipitation dirigée contre l'épitope myc a été réalisée en utilisant le kit « Milteniy c-myc tagged protein isolation kit »: 24h après transfection, les cellules ont été collectées et lysées dans le tampon fourni (150mM NaCl, 1% triton X100, 50mM tris HCl pH8), pendant 30 min sur la glace avec agitation, puis les lysats ont été clarifiés par centrifugation pendant 10 min à 13000 tours/min à +4°C. Les surnageants ainsi obtenus ont formé les extraits cellulaires, dont 10% ont été analysés par western blot pour contrôler l'expression des protéines d'intérêt (selon la procédure standard), alors que les 90% restants ont été soumis à l'Immunoprécipitation, selon les instructions du fournisseur, et à l'aide du système de billes magnétiques « Milteniy μ MACS separation column ». Brièvement, il a s'agit d'incuber le lysat avec 50 μl de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-myc pendant 1h sous agitation, puis de déposer la mixture sur les colonnes accrochées à l'aimant (μ MACS multi-stand), puis de rincer les colonnes 4 fois par 200 μl de tampon de lavage n°1 (WB1 : 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 50mM Tris HCl - pH 8) et une fois par 100 μl de tampon de lavage n°2 (WB2 : 20mM Tris HCl – pH 7,5) . Ensuite, les protéines restant attachées ont été détachées par ajout de 20 μl de tampon d'élution (50mM Tris HCl – pH 6,8, 50 mM DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,005% bleu de bromophénol) préchauffé à 95°C, pendant 5 min. L'élution a enfin été réalisée par ajout de 50 μl de tampon d'élution préchauffé à 95°C.

Immunoprécipitation contre les épitopes HA et FLAG

Les immunoprécipitations dirigées contre l'épitope HA ou contre l'épitope FLAG ont été réalisées de la même façon en utilisant le gel « EZ view red anti-HA affinity » ou le gel « EZ view red anti-FLAG affinity », respectivement (tous les deux de SIGMA). Les cellules ont été récoltées et lysées dans le tampon COIP (ColImmunoPrecipitation Buffer : tris HCL 20mM, NaCl 100mM, EDTA 5mM, 0,4% sodium deoxycholate, 1% NP40, complete mini protease inhibitor (Roche)) pendant 30 min dans la glace, puis centrifugées 10min à 13000 rpm à +4°C. Le surnageant ainsi obtenu forme l'extrait cellulaire. 10% de ce surnageant a été analysé par western blot pour contrôler l'expression des protéines d'intérêt tandis que les 90% restants ont été soumis à la réaction d'immunoprécipitation pendant 2h à +4°C sous agitation, avec 20 μl du gel préalablement équilibré par 3 lavages dans le tampon COIP. Les immunoprécipités ainsi obtenus ont alors été collectés et le gel a été lavé 3 fois dans du tampon COIP. Les Immunoprécipités ont été élués de la résine par addition d'une solution de SDS- β MerCaptoéthanol et par chauffage 5 min à 96°C. Les échantillons ont enfin été centrifugés rapidement pour culoter les billes, avant d'être analysés par western blot.

Immunofluorescence indirecte

Des cellules Vero ont été cultivées sur des lamelles en verre à une densité de 60%, avant d'être transfectées. 16h après transfection, les cellules ont été fixées. Deux protocoles différents ont été employés pour la fixation : soit par une solution composée de 50% d'Acétone et 50% de Méthanol, pendant 20 min à -20°C ; soit par une solution à 4% de PFA 20 min à 4°C, suivie d'une étape d'inactivation de la PFA grâce à de la Glycine à 0,1M, et d'une perméabilisation par une solution à 0,1% de Triton X100. Dans les deux cas, les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec du PBS, et incubés 20 min dans de la solution de blocage (2% BSA-5% Glycérol-0,2% Tween en PBS). Les lamelles ont alors été incubées dans une dilution d'anticorps primaire pendant 1h, avant d'être rincées 3 fois 5 min dans de la solution de blocage, puis incubées 1h dans une dilution d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor, Invitrogen) dilué au 1 :2000 dans la solution de blocage. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois 5 min dans la solution de blocage, 1 fois en PBS et 1 fois avec de l'eau distillée. Enfin, les lamelles ont été montées sur lame en utilisant un milieu de montage contenant du DAPI (Prolong gold anti-Fade Reagent, Invitrogen). Les lamelles ont été séchées une nuit au moins avant d'être analysées avec un microscope à fluorescence (Zeiss). Les images obtenues ont finalement été retravaillées en utilisant le programme Axiovision (Zeiss).

Le sérum polyclonal de lapin anti MARV VP24 que nous avons généré au laboratoire n'était pas efficace en Immunofluorescence dans la mesure où il était responsable d'un marquage non spécifique des cellules. Afin de diminuer ce bruit de fond, nous avons au préalable réalisé une étape de clarification du sérum, en pré-incubant le sérum dilué au 1 :10^e sur des cellules Vero préalablement fixées par une solution de PFA à 4% et perméabilisées par une solution à 0,1% de triton X100. Le protocole de clarification a été conduit sur la nuit à +4°C et sous agitation. Le sérum a ensuite été récupéré et dilué au 1/10^{ème} pour l'immunofluorescence.

Test d'activité d'un gène rapporteur

L'activité de facteurs de transcription a été déterminée par l'utilisation de systèmes dits de « gènes rapporteurs » dont l'expression est sous le contrôle du promoteur d'intérêt du facteur de transcription. Brièvement, il s'agit de mesurer l'activité de la Luciférase (Firefly) dont l'expression est gouvernée par l'activation du facteur de transcription concerné. L'activité de la Luciférase a été mesurée grâce au kit Dual Glo Luciferase (Promega) et les valeurs de luminescence ont été lues sur un lecteur de plaque (Tecan Infinite). Les valeurs obtenues ont été normalisées grâce à l'expression concomitante de la Renilla Luciférase, codée par le pRLTK, et dont l'activité est mesurée lors de la 2^{ème} étape de lecture. Le ratio Activité Firefly/Activité Renilla a été calculé pour chaque échantillon et la valeur de base (cellules non traitées ou cellules transfectées avec un plasmide vide) a servi de référence pour le calcul de l'induction (Fold=1).

Activité pHHO1-Luc (Facteur Nrf2)

Des cellules 293T ont été transfectées par les plasmides pHHO1-Luc, pRLTK, et les plasmides indiqués pour chaque expérience. Les taux d'ADN transfectés dans chaque échantillon ont été uniformisés par addition du vecteur pHCMV vide. 24h après transfection, les cellules ont été resuspendues dans du PBS et 75µl de cette resuspension fut employée pour déterminer l'activité des Luciférases, comme expliqué précédemment.

Activité ErrEtk-Luciférase (Facteur ERRa)

Des cellules Hela ont été transfectées par pRLTK, pGL3-ErrEtk-Luciférase, et les plasmides indiqués pour chaque expérience. Les taux d'ADN transfectés dans chaque échantillon ont été uniformisés par addition du vecteur pHCMV vide. Les cellules ont été maintenues en culture 48h avant d'être resuspendues dans du PBS, et 75µl de cette suspension a été employée pour déterminer l'activité des Luciférases, comme expliqué précédemment.

Test TransAM de liaison à l'ADN (Active Motif) pour le facteur Nrf2

Les cellules ont été collectées, lavées en PBS et lysées par du tampon hypotonique (50mM Tris HCl pH 7,5-25mM KCl-5mM MgCl₂) pendant 15 min sur la glace. Du NP40 a alors été ajouté à une concentration finale de 0,5% et les lysats ont été homogénéisés puis centrifugés 30 secondes à +4°C. Les surnageants ont été récoltés pour former la fraction cytoplasmique. Les culots obtenus ont été resuspendus dans le « complete lysis buffer » fourni par la compagnie. La solubilisation des composants du noyau a été poursuivie pendant 30 min sur la glace, et les extraits ont ensuite été centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min à +4°C. Les surnageants ainsi obtenus forment la fraction nucléaire. Le test de liaison à l'ADN a été réalisé sur 10µl de ces fractions nucléaires. Pour cela, ces fractions ont été déposées dans des puits dont le fond était tapissé des séquences cibles de Nrf2 (ARE : séquence 5'-GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3'). L'accrochage a été poursuivi pendant 1h à température ambiante sous agitation, puis les puits ont été lavés 3 fois. La présence de Nrf2 a été mesurée par immuno-marquage 1h à température ambiante avec un anticorps anti-Nrf2 produit chez le lapin dilué au 1:1000^{ème}. Les puits ont été lavés, puis un anticorps secondaire anti-lapin, couplé à la HRP, a été utilisé au 1:1000^{ème} pour la révélation. La présence de Nrf2 a été détectée par ajout d'une solution de développement (developing solution) contenant le substrat de la HRP. L'activité de la HRP résulte en la formation d'un composé jaune, puis la réaction a été arrêtée au bout de 5 min de développement grâce à l'ajout de la solution d'arrêt fournie dans le kit (Stop Solution), cette solution induit un changement de couleur, et la réaction devient bleue. Cette réaction colorimétrique a été quantifiée par lecture de la Densité Optique à 455 nm, normalisée par l'absorbance du plastique à 650 nm.

Détermination de la Dose Infectieuse en Culture de Tissus (TCID₅₀)

Autant pour EBOV que pour MARV, les virus ont été dosés par la détermination de la Dose Infectieuse en Culture de Tissu (TCID₅₀/ml). Pour ce faire, une série de 12 dilutions d'un pas de 10 a été réalisée à partir du stock viral dont le titre devait être déterminé (dilution 10⁻¹ à 10⁻¹²). Ces dilutions ont ensuite été employées pour infecter une plaque 96 puits de cellules Vero E6 à 40% de confluence, les 8 puits de chaque colonne de la plaque ayant été infectés par la même dilution. La réplication virale a été poursuivie pendant 7 jours, puis les cellules ont été fixées par une solution de Crystal Violet à 4% de PFA pendant 20 min. Les plaques ont ensuite été lavées à l'eau du robinet puis la lecture a été effectuée en recherchant un effet cytopathique dans chaque puit à l'aide d'un microscope optique. Le titre viral a été calculé en employant la formule de Karber :

$$\log \text{TCID}_{50} = a - D (\text{Sp} - 0,5)$$

avec : -a: dernière dilution avec laquelle tous les puits sont positifs (infectés)

-D: logarithme décimal du facteur de dilution (dilution d'un pas de 10, Log₁₀=1)

-Sp: somme des proportions de puits positifs (proportion= nombre de puits positifs/nombre de puits de la colonne) pour les colonnes situées entre la dernière où tous les puits sont positifs et la première où tous les puits sont négatifs.

Pour l'infection virale, les cellules ont été comptées et le nombre de TCID₅₀ total employées a été calculé en fonction de la Multiplicité d'infection (MOI) désirée.

Western Blot et Western Blot semi-quantitatif

Les lysats cellulaires générés dans les différentes expériences ont été repris dans du tampon Laemmli (SDS 2%, Glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol). Dans le cas d'échantillons infectieux, une inactivation par la chaleur a été réalisée pendant 10 min à 96°C dans le laboratoire P4.

Quelle que soit leur nature, les échantillons ont été chauffés 5 min à 96°C afin de dénaturer les protéines, juste avant d'être chargés sur un gel de polyacrylamide 6%. Les protéines ainsi séparées selon leur poids moléculaire ont été transférées sur une membrane de PVDF par un protocole de transfert semi-sec employant un Trans-Blot Semi Dry transfert cell (Biorad). Les membranes ont alors été saturées dans une dilution de 10% de lait en PBS pendant 1h, incubées sur la nuit à +4°C sous agitation dans une dilution d'anticorps primaire dans une solution à 1% de lait et 0,1% de Tween en PBS. Les membranes ont ensuite été lavées puis incubées dans une dilution d'anticorps secondaire couplé à la HRP dans une solution à 1% de lait et 0,1% de Tween. Les membranes ont enfin été révélées par ajout du substrat de la HRP grâce au SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). La révélation du signal a été réalisée par impression sur un film radiographique (Biomax MR, Kodak).

Dans le cas des westerns blot semi quantitatifs, la même procédure a été réalisée. Le signal obtenu a ensuite été numérisé et quantifié à l'aide du Chemidoc XRS Imager (Biorad). Les valeurs des intensités obtenues ont été rapportées aux valeurs obtenues pour l'intensité de l'actine pour les mêmes échantillons et la même membrane. Ces ratios ont été comparés aux ratios obtenus pour le contrôle négatif dans chaque expérience (valeur du ratio du contrôle négatif rapportée à 1).

Mutagenèse dirigée

Des mutants protéiques de la protéine Keap1 ont été obtenus par mutagenèse dirigée sur le plasmide pDEST-myc. Pour ce faire, une PCR a été réalisée à l'aide de la Polymérase Pfu Ultra (Stratagène), en utilisant des amorces complémentaires porteuses de la mutation désirée. La durée de l'étape d'élongation de la PCR a été optimisée afin de permettre de générer à chaque cycle de PCR un plasmide entier. Le produit de PCR obtenu a été traité à la Dpn1, une enzyme de restriction permettant de digérer le plasmide sauvage méthylé. Le produit de mutagenèse obtenu a ensuite été introduit dans des bactéries compétentes de type XL Gold par transformation, extrait, vérifié par séquençage puis amplifié.

Stratégie de clonage Gateway

La plupart des plasmides générés dans cette étude ont été obtenus en suivant le protocole classique d'amplification par PCR du gène d'intérêt/Digestion/Ligation. Pour les plasmides utilisés dans le crible double hybride en levures ainsi que pour les plasmides codant pour des protéines recombinantes

porteuses de l'épitope myc à leur extrémité amino-terminale, la stratégie Gateway (Invitrogen®) a été utilisée. Dans ce cas, les gènes d'intérêt ont été amplifiés par PCR avec des amorces porteuses des séquences attB1 (amorce sens) et attB2 (amorce antisens) de part et d'autre du gène d'intérêt. Le produit de PCR obtenu a ensuite été intégré dans un plasmide donneur (pDONR207) par recombinaison BP, en apportant la BP-recombinase (Invitrogen, incubation 1h à température ambiante). Le pDONR207 possède les sites attP1 et attP2 capables de recombiner avec attB1 et attB2 pour permettre l'insertion du fragment d'ADN d'intérêt.

Les produits de recombinaison ainsi obtenus, appelés vecteurs donneurs portaient le gène d'intérêt flanqué des séquences attR1 et attR2, et ont été séquencés. Ils ont ensuite été utilisés pour générer les plasmides d'expression en levures (pPC97) ou les plasmides myc (pDEST-myc), en réalisant une étape de recombinaison LR, grâce à la recombinase LR (Invitrogen, recombinaison 1h à température ambiante). De même que précédemment, les plasmides accepteurs (pPC86 et pDEST-myc) vides étaient en effet porteurs des sites de recombinaison attL1 et attL2, pouvant se recombiner avec les sites attR1 et attR2 pour insérer le gène d'intérêt dans les vecteurs d'expression souhaités. Le produit de LR a été transformé dans des bactéries, extrait, analysé par séquençage puis amplifié.

ANNEXES

ANNEXE 1: ABSTRACT DE LA PUBLICATION EN COURS D'ECRITURE.

VP24 of Marburgvirus acts as an activator of Nrf2 pathway by targeting Keap1 protein.

Page A.¹, Mateo M.¹, Nemirov K.¹, Reid St P.¹, Tafforeau L.², , Reynard O.¹, Ottmann M.¹, Lotteau V.² and Volchkov VE.¹

1: Filovirus Laboratory, INSERM U758, Lyon, France - 2: IMA team, INSERM U851, Lyon, France.

Marburg virus (MARV) is the causative agent for a severe hemorrhagic syndrome with high fatality rate. MARV virion is composed of seven structural proteins, and among them VP24 has been shown to possess properties of a matrix protein (membrane association, oligomerisation and interaction with nucleocapsids), even though another protein, VP40, acts as a major matrix protein by directing virion egress. It was previously shown that VP24 is indispensable for the virus replicative cycle, and it was suggested that this protein may act in directing the condensation of viral Nucleocapsids and their transport to the plasma membrane where they will then be covered by matrix VP40 to finally bud. In this regard, it is likely that VP24 will be involved in binding cellular proteins to facilitate movement of viral particles inside the cell. A better understanding of the function of VP24 during MARV replicative cycle thus required identification of its cellular partners. To do so, we performed a yeast double-hybrid screening and identified Keap1 (Kelch-like-ECH associated protein 1) as a putative partner for MARV VP24. Keap1 works as a cellular sensor for oxidative stress in cells, and inhibits the Nrf2 transcription factor. Oxidative stress in cells results in conformational changes of Keap1, leading to liberation of Nrf2 from Keap1 and induction of the antioxidant response pathway. Studies in mammalian cells confirmed interaction between VP24 and Keap1, and furthermore, analysis of Keap1 mutants identified the Nrf2 binding site of Keap1 as a target of VP24. Further functional assays revealed that VP24 induces activation of Nrf2, both in transfected and in infected cells. This study is the first to identify a function for MARV VP24, regarding its impact on cellular function. Targeting the antioxidant pathway could thus be an interesting target to prevent MARV replication and build antiviral strategy.

ANNEXE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PRESENTATIONS.

Liste des publications :

Knockdown of Ebola Virus VP24 Impairs Viral Nucleocapsid Assembly and Prevents Virus Replication.

Mateo M, Carbonnelle C, Martinez MJ, Reynard O, **Page A**, Volchkova VA, Volchkov VE.

J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S892-6.

Conserved Proline-Rich Region of Ebola Virus Matrix Protein VP40 Is Essential for Plasma Membrane Targeting and Virus-Like Particle Release.

Reynard O, Nemirov K, **Page A**, Mateo M, Raoul H, Weissenhorn W, Volchkov VE.

J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S884-91.

Unconventional Secretion of Ebola Virus Matrix Protein VP40.

Reynard O, Reid SP, **Page A**, Mateo M, Alazard-Dany N, Raoul H, Basler CF, Volchkov VE.

J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S833-9.

Kunjin Virus Replicon-Based Vaccines Expressing Ebola Virus Glycoprotein GP Protect the Guinea Pig Against Lethal Ebola Virus Infection.

Reynard O, Mokhonov V, Mokhonova E, Leung J, **Page A**, Mateo M, Pyankova O, Georges-Courbot MC, Raoul H, Khromykh AA, Volchkov VE.

J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S1060-5.

VP24 Is a Molecular Determinant of Ebola Virus Virulence in Guinea Pigs.

Mateo M, Carbonnelle C, Reynard O, Kolesnikova L, Nemirov K, **Page A**, Volchkova VA, Volchkov VE.

J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S1011-20.

Participation aux colloques, congrès et séminaires – Liste des posters :

CARTE FONCTIONNELLE DES PROTEINES NP ET VP24 DU VIRUS EBOLA

Audrey Page, Mathieu Matéo, Sébastien Delpeut, Viktor Volchkov, Michèle Ottmann. Avril 2007 : Journées francophones de virologie, Paris, France.

A CONSERVED PROLINE-RICH REGION OF EBOLAVIRUS MATRIX PROTEIN VP40 IS ESSENTIAL FOR PLASMA MEMBRANE TARGETING

Olivier Reynard, **Audrey Page**, Winfried Weissenhorn, Viktor Volchkov. Septembre 2007 : Third European congress of Virology, Nürnberg, Germany.

L'INTERACTION ENTRE LA PROTEINE VP35 DU VIRUS EBOLA ET LA FORME ACTIVE DE LA PROTEINE KINASE DEPENDANTE D'ARN BICATENAIRE (PKR) AUGMENTE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE VIA LA DEPHOSPHORYLATION DE LA PKR

Sébastien Delpeut, Michael Schuman, Elke Mulberger, Didier Décimo, Théophile Ohlmann, **Audrey Page**, Viktor Volchkov. Mars 2008: Rencontre DGA Recherche et Innovations scientifique, Paris, France.

MUTATIONS WITHIN VP35 DSRNA BINDING DOMAIN COMPLETELY ATTENUATE EBOLA VIRUS IN VIVO.

Volchkova VA, Delpeut S, Prins KC, Reynard O, Mateo M, Reid SP, **Page A**, Basler CF & Volchkov VE. Juin 2010 : XIV International conference on Negative Strand Viruses, Brugges, Belgium.

IDENTIFICATION OF A NEW FUNCTION FOR MARBURG VP24.

Page A, Mateo M, Reid StP, Reynard O, Volchkova V, Ottmann M, Lotteau V, Volchkov VE. Juin 2010 : XIV International conference on Negative Strand Viruses, Brugges, Belgium.

STRUCTURAL PROTEIN VP24 OF MARBURG VIRUS INTERACTS WITH KEAP1 PREVENTING ITS INHIBITORY EFFECT ON NRF2.

Audrey Page, M. Mateo, O. Reynard, S.P. Reid, K. Nemirov, M. Ottmann, L. Tafforeau, V. Lotteau, and V.E. Volchkov. Octobre 2011 : European congress on viral zoonoses, St Raphael, France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kuhn, J.H., et al., *Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains involved in the recent outbreaks in Russia*. Arch Virol, 2004. **149**(11): p. 2199-213.
2. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 5th ed 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
3. Paddock, C.D., et al., *Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1527-35.
4. Slenczka, W. and H.D. Klenk, *Forty years of marburg virus*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S131-5.
5. Kissling, R.E., et al., *Agent of disease contracted from green monkeys*. Science, 1968. **160**(830): p. 888-90.
6. Siegert, R., et al., *The aetiology of an unknown human infection transmitted by monkeys (preliminary communication)*. Ger Med Mon, 1968. **13**(1): p. 1-2.
7. Johnson, K.M., et al., *Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire*. Lancet, 1977. **1**(8011): p. 569-71.
8. Bowen, E.T., et al., *Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent*. Lancet, 1977. **1**(8011): p. 571-3.
9. *After Marburg, Ebola*. Lancet, 1977. **1**(8011): p. 581-2.
10. Morikawa, S., M. Saijo, and I. Kurane, *Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Reston)*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2007. **30**(5-6): p. 391-8.
11. Le Guenno, B., et al., *Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus*. Lancet, 1995. **345**(8960): p. 1271-4.
12. MacNeil, A., et al., *Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda*. Emerg Infect Dis. **16**(12): p. 1969-72.
13. Towner, J.S., et al., *Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000212.
14. Petrosino, J.F., et al., *Metagenomic pyrosequencing and microbial identification*. Clin Chem, 2009. **55**(5): p. 856-66.
15. Barrette, R.W., et al., *Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus*. Science, 2009. **325**(5937): p. 204-6.
16. *Outbreak news. Ebola Reston in pigs and humans, Philippines*. Wkly Epidemiol Rec, 2009. **84**(7): p. 49-50.
17. *Outbreak news. Ebola, Uganda*. Wkly Epidemiol Rec. **86**(22): p. 221.
18. Francesconi, P., et al., *Ebola hemorrhagic fever transmission and risk factors of contacts, Uganda*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(11): p. 1430-7.
19. Roels, T.H., et al., *Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: risk factors for patients without a reported exposure*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 1**: p. S92-7.
20. WorldHealthOrganisation, *Fièvre hémorragique à virus Ébola*. Centre des Médias, 2008. **Aide-mémoire N°103**.
21. *Outbreak of Marburg haemorrhagic fever: Uganda, June-August 2007*. Wkly Epidemiol Rec, 2007. **82**(43): p. 381-4.
22. Pringle, C.R., *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) activity report*. Arch Virol, 1995. **140**(11): p. 2100-3.
23. Kiley, M.P., et al., *Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses?* Intervirology, 1982. **18**(1-2): p. 24-32.
24. Mihindukulasuriya, K.A., et al., *Nyamanini and midway viruses define a novel taxon of RNA viruses in the order Mononegavirales*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5109-16.
25. Kuhn, J.H., et al., *Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations*. Arch Virol, 2010. **155**(12): p. 2083-103.
26. Bukreyev, A.A., et al., *The complete nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain*. Arch Virol, 1995. **140**(9): p. 1589-600.

27. Bausch, D.G., et al., *Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus*. N Engl J Med, 2006. **355**(9): p. 909-19.
28. Towner, J.S., et al., *Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6497-516.
29. Valmas, C., et al., *Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000721.
30. Barrette, R.W., et al., *Current perspectives on the phylogeny of Filoviridae*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(7): p. 1514-9.
31. Negredo A, P.G., Vazquez-Moron S, Gonzales F, Dopazo H, Molero F, *Discovery of an Ebolavirus-like Filovirus in Europe*. PLOS pathogens, 2011.
32. Negredo, A., et al., *Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002304.
33. Peterson, A.T., et al., *Potential mammalian filovirus reservoirs*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(12): p. 2073-81.
34. Leroy, E.M., et al., *Fruit bats as reservoirs of Ebola virus*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 575-6.
35. Morvan, J.M., et al., *Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic*. Microbes Infect, 1999. **1**(14): p. 1193-201.
36. A.A. Arata, B.J., *Approaches toward studies on potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in southern Sudan*. 1978. **Ebola Virus Haemorrhagic Fever**: p. 191-200.
37. Leroy, E.M., et al., *Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife*. Science, 2004. **303**(5656): p. 387-90.
38. Walsh, P.D., et al., *Catastrophic ape decline in western equatorial Africa*. Nature, 2003. **422**(6932): p. 611-4.
39. Whitfield, J., *Ape populations decimated by hunting and Ebola virus*. Nature, 2003. **422**(6932): p. 551.
40. Rouquet, P., et al., *Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 283-90.
41. Towner, J.S., et al., *Marburg virus infection detected in a common African bat*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e764.
42. Krahling, V., et al., *Establishment of fruit bat cells (Rousettus aegyptiacus) as a model system for the investigation of filoviral infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8): p. e802.
43. Bausch, D.G., et al., *Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(12): p. 1531-7.
44. Leroy, E.M., et al., *Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009. **9**(6): p. 723-8.
45. Timen, A., et al., *Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherlands*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(8): p. 1171-5.
46. *Imported case of Marburg hemorrhagic fever - Colorado, 2008*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(49): p. 1377-81.
47. Tomori, O., et al., *Serologic survey among hospital and health center workers during the Ebola hemorrhagic fever outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S98-101.
48. Normile, D., *Emerging infectious diseases. Scientists puzzle over Ebola-Reston virus in pigs*. Science, 2009. **323**(5913): p. 451.
49. Kobinger, G.P., et al., *Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs*. J Infect Dis, 2011. **204**(2): p. 200-8.
50. Halpin, K., et al., *Pteropid Bats are Confirmed as the Reservoir Hosts of Henipaviruses: A Comprehensive Experimental Study of Virus Transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **85**(5): p. 946-951.
51. Bellini, W.J., et al., *Nipah virus: an emergent paramyxovirus causing severe encephalitis in humans*. J Neurovirol, 2005. **11**(5): p. 481-7.
52. Wittmann, T.J., et al., *Isolates of Zaire ebolavirus from wild apes reveal genetic lineage and recombinants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17123-7.
53. Taylor, D.J., R.W. Leach, and J. Bruenn, *Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 193.
54. Belyi, V.A., A.J. Levine, and A.M. Skalka, *Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001030.

55. Horie, M., et al., *Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes*. Nature, 2010. **463**(7277): p. 84-7.
56. Kortepeter, M.G., D.G. Bausch, and M. Bray, *Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic Fever*. J Infect Dis, 2011. **204** Suppl 3: p. S810-6.
57. Roddy, P., et al., *Factors associated with Marburg hemorrhagic fever: analysis of patient data from Uige, Angola*. J Infect Dis. **201**(12): p. 1909-18.
58. Hoenen, T., et al., *Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease*. Trends Mol Med, 2006. **12**(5): p. 206-15.
59. Feldmann, H. and T.W. Geisbert, *Ebola haemorrhagic fever*. Lancet, 2011. **377**(9768): p. 849-62.
60. Mahanty, S. and M. Bray, *Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(8): p. 487-98.
61. Kuhn, J.H., *Filoviruses. A compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies*. Arch Virol Suppl, 2008. **20**: p. 13-360.
62. Bwaka, M.A., et al., *Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S1-7.
63. Ascenzi, P., et al., *Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(3): p. 151-85.
64. Bowen, E.T., et al., *Ebola haemorrhagic fever: experimental infection of monkeys*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1978. **72**(2): p. 188-91.
65. Geisbert, T.W., et al., *Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2347-70.
66. Geisbert, T.W., et al., *Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2371-82.
67. Takada, A., et al., *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 2943-7.
68. Soilleux, E.J., et al., *Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 445-57.
69. Marzi, A., et al., *DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 12090-5.
70. Matsuno, K., et al., *C-type lectins do not act as functional receptors for filovirus entry into cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(1): p. 144-8.
71. Kondratowicz, A.S., et al., *T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(20): p. 8426-31.
72. Ray, R.B., et al., *Ebola virus glycoprotein-mediated anoikis of primary human cardiac microvascular endothelial cells*. Virology, 2004. **321**(2): p. 181-8.
73. Yang, Z.Y., et al., *Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 886-9.
74. Chan, S.Y., et al., *Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4933-7.
75. Alazard-Dany, N., et al., *Ebola virus glycoprotein GP is not cytotoxic when expressed constitutively at a moderate level*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 5): p. 1247-57.
76. Okumura, A., et al., *Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 27-33.
77. Weissenhorn, W., et al., *Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain*. Mol Cell, 1998. **2**(5): p. 605-16.
78. Volchkov, V.E., et al., *Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity*. Science, 2001. **291**(5510): p. 1965-9.
79. Bosio, C.M., et al., *Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation*. J Infect Dis, 2003. **188**(11): p. 1630-8.
80. Mahanty, S., et al., *Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2797-801.
81. Mohamadzadeh, M., et al., *Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 7235-44.
82. Bray, M., *The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 6): p. 1365-73.

83. Hensley, L.E., et al., *Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. Immunol Lett, 2002. **80**(3): p. 169-79.
84. Takaoka, A. and H. Yanai, *Interferon signalling network in innate defence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(6): p. 907-22.
85. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber, *The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses*. Virology, 2006. **344**(1): p. 119-30.
86. Gupta, M., et al., *Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro*. Virology, 2001. **284**(1): p. 20-5.
87. Basler, C.F., et al., *The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12289-94.
88. Basler, C.F., et al., *The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7945-56.
89. Feng, Z., et al., *The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR*. J Virol, 2007. **81**(1): p. 182-92.
90. Schumann, M., T. Gantke, and E. Muhlberger, *Ebola virus VP35 antagonizes PKR activity through its C-terminal interferon inhibitory domain*. J Virol, 2009. **83**(17): p. 8993-7.
91. Cardenas, W.B., et al., *Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5168-78.
92. Leung, D.W., et al., *Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 165-72.
93. Chang, T.H., et al., *Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000493.
94. Prins, K.C., W.B. Cardenas, and C.F. Basler, *Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3069-77.
95. Reid, S.P., et al., *Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5156-67.
96. Reid, S.P., et al., *Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13469-77.
97. Mateo, M., et al., *Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 1169-75.
98. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 559-68.
99. Grosch M, K.J., Muhlberger E., *Interference of marburg and ebola viruses with the type I IFN response: induction and signalling*. Conferences on Negative Strand Viruses, 2006. **13**(Abstract book): p. 139.
100. Valmas, C. and C.F. Basler, *Marburg virus VP40 antagonizes interferon signaling in a species-specific manner*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4309-17.
101. Ding, S.W., *RNA-based antiviral immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 632-44.
102. Fabozzi, G., et al., *Ebolavirus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway*. J Virol, 2011. **85**(6): p. 2512-23.
103. Baize, S., et al., *Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 423-6.
104. Geisbert, T.W., et al., *Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses*. Lab Invest, 2000. **80**(2): p. 171-86.
105. Badovinac, V.P. and J.T. Harty, *Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 67-80.
106. Bradfute, S.B., K.L. Warfield, and S. Bavari, *Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4058-66.
107. Ksiazek, T.G., et al., *Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S177-87.
108. Rubins, K.H., et al., *The temporal program of peripheral blood gene expression in the response of nonhuman primates to Ebola hemorrhagic fever*. Genome Biol, 2007. **8**(8): p. R174.
109. Baize, S., et al., *Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system?* Apoptosis, 2000. **5**(1): p. 5-7.
110. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.

111. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
112. Gibb, T.R., et al., *Pathogenesis of experimental Ebola Zaire virus infection in BALB/c mice*. J Comp Pathol, 2001. **125**(4): p. 233-42.
113. Schnittler, H.J., et al., *Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1301-9.
114. Fisher-Hoch, S.P., et al., *Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola)*. J Infect Dis, 1985. **152**(5): p. 887-94.
115. Baize, S., et al., *Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 163-8.
116. Sanchez, A., et al., *Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10370-7.
117. Geisbert, T.W., et al., *Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event*. J Infect Dis, 2003. **188**(11): p. 1618-29.
118. Geisbert, T.W., et al., *Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys*. Lancet, 2003. **362**(9400): p. 1953-8.
119. Leroy, E.M., et al., *Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response*. Lancet, 2000. **355**(9222): p. 2210-5.
120. Leroy, E.M., et al., *Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(3): p. 453-60.
121. Siegert, R., H.L. Shu, and W. Slenczka, *[Isolation and identification of the "Marburg virus"]*. Dtsch Med Wochenschr, 1968. **93**(12): p. 604-12.
122. Geisbert, T.W. and P.B. Jahrling, *Differentiation of filoviruses by electron microscopy*. Virus Res, 1995. **39**(2-3): p. 129-50.
123. Takada, A., et al., *Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2324-30.
124. Jasenosky, L.D. and Y. Kawaoka, *Filovirus budding*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 181-8.
125. Hartlieb, B. and W. Weissenhorn, *Filovirus assembly and budding*. Virology, 2006. **344**(1): p. 64-70.
126. Feldmann, H. and H.D. Klenk, *Filoviruses*. 1996.
127. Mavrakakis, M., et al., *Morphology of Marburg virus NP-RNA*. Virology, 2002. **296**(2): p. 300-7.
128. Feldmann, H., H.D. Klenk, and A. Sanchez, *Molecular biology and evolution of filoviruses*. Arch Virol Suppl, 1993. **7**: p. 81-100.
129. Sanchez, A. and P.E. Rollin, *Complete genome sequence of an Ebola virus (Sudan species) responsible for a 2000 outbreak of human disease in Uganda*. Virus Res, 2005. **113**(1): p. 16-25.
130. Sanchez, A., et al., *Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus*. Virus Res, 1993. **29**(3): p. 215-40.
131. Ikegami, T., et al., *Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. Brief report*. Arch Virol, 2001. **146**(10): p. 2021-7.
132. Weik, M., et al., *The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10660-71.
133. Whelan, S.P., J.N. Barr, and G.W. Wertz, *Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 61-119.
134. Crary, S.M., et al., *Analysis of the role of predicted RNA secondary structures in Ebola virus replication*. Virology, 2003. **306**(2): p. 210-8.
135. Muhlberger, E., et al., *The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses*. Virology, 1992. **187**(2): p. 534-47.
136. Volchkov, V.E., et al., *Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 2): p. 355-62.
137. Weik, M., et al., *Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8532-9.
138. Muhlberger, E., et al., *Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure*. Virology, 1996. **223**(2): p. 376-80.
139. Feldmann, H., et al., *Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle*. Virus Res, 1992. **24**(1): p. 1-19.

140. Volchkov, V.E., et al., *GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases*. Virology, 1995. **214**(2): p. 421-30.
141. Becker, S., et al., *The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 4): p. 809-18.
142. Huang, Y., et al., *The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 307-16.
143. Sanchez, A., et al., *Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 2): p. 347-57.
144. Kolesnikova, L., et al., *Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3899-904.
145. Watanabe, S., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3743-51.
146. Elliott, L.H., M.P. Kiley, and J.B. McCormick, *Descriptive analysis of Ebola virus proteins*. Virology, 1985. **147**(1): p. 169-76.
147. Shi, W., et al., *A filovirus-unique region of Ebola virus nucleoprotein confers aberrant migration and mediates its incorporation into virions*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6190-9.
148. Noda, T., et al., *Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3554-62.
149. Dolnik, O., et al., *Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles*. J Virol, 2010. **84**(15): p. 7847-56.
150. Becker, S., et al., *Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins*. Virology, 1998. **249**(2): p. 406-17.
151. Modrof, J., et al., *Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions*. Virology, 2001. **287**(1): p. 171-82.
152. Groseth, A., et al., *The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified*. Virus Res, 2009. **140**(1-2): p. 8-14.
153. Modrof, J., et al., *Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33099-104.
154. Martinez, M.J., et al., *Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12569-73.
155. John, S.P., et al., *Ebola virus VP30 is an RNA binding protein*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8967-76.
156. Modrof, J., S. Becker, and E. Muhlberger, *Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3334-8.
157. Muhlberger, E., et al., *Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8756-64.
158. Muhlberger, E., et al., *Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2333-42.
159. Enterlein, S., et al., *The marburg virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of ebola virus*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4508-19.
160. Enterlein, S., et al., *Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 1038-43.
161. Hartlieb, B., et al., *Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41830-6.
162. Hartlieb, B., et al., *Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 624-9.
163. Bukreyev, A.A., et al., *The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. Homology between Marburg and Ebola viruses*. FEBS Lett, 1993. **322**(1): p. 41-6.
164. Noda, T., et al., *Regions in Ebola virus VP24 that are important for nucleocapsid formation*. J Infect Dis, 2007. **196** Suppl 2: p. S247-50.
165. Johnson, R.F., P. Bell, and R.N. Harty, *Effect of Ebola virus proteins GP, NP and VP35 on VP40 VLP morphology*. Virol J, 2006. **3**: p. 31.
166. Johnson, R.F., et al., *Ebola virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA into virus-like particles*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5135-44.
167. Prins, K.C., et al., *Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function*. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10581-91.

168. Prins, K.C., et al., *Mutations abrogating VP35 interaction with double-stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs*. J Virol, 2010. **84**(6): p. 3004-15.
169. Reid, S.P., W.B. Cardenas, and C.F. Basler, *Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein*. Virology, 2005. **341**(2): p. 179-89.
170. Moller, P., et al., *Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14876-86.
171. Boehmann, Y., et al., *A reconstituted replication and transcription system for Ebola virus Reston and comparison with Ebola virus Zaire*. Virology, 2005. **332**(1): p. 406-17.
172. Poch, O., et al., *Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3867-74.
173. Ferron, F., et al., *Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(5): p. 222-4.
174. Garoff, H., R. Hewson, and D.J. Opstelten, *Virus maturation by budding*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1171-90.
175. Ruigrok, R.W., et al., *Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus*. J Mol Biol, 2000. **300**(1): p. 103-12.
176. Dessen, A., et al., *Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4228-36.
177. Dessen, A., et al., *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 6): p. 758-60.
178. Scianimanico, S., et al., *Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein*. EMBO J, 2000. **19**(24): p. 6732-41.
179. Hoenen, T., et al., *VP40 octamers are essential for Ebola virus replication*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1898-905.
180. Gomis-Ruth, F.X., et al., *The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties*. Structure, 2003. **11**(4): p. 423-33.
181. Hoenen, T., et al., *Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7053-63.
182. Hoenen, T., et al., *Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription*. Virology, 2010. **403**(1): p. 56-66.
183. Nguyen, T.L., et al., *An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: structural insights into the monomer-hexamer transition*. J Struct Biol, 2005. **151**(1): p. 30-40.
184. Kolesnikova, L., et al., *Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope*. J Virol, 2004. **78**(22): p. 12277-87.
185. Kolesnikova, L., et al., *VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1825-38.
186. Bavari, S., et al., *Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 593-602.
187. Yamayoshi, S., et al., *Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(3): p. 168-77.
188. Ruthel, G., et al., *Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4709-19.
189. Kolesnikova, L., et al., *Budding of Marburgvirus is associated with filopodia*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 939-51.
190. Noda, T., et al., *Assembly and budding of Ebolavirus*. PLoS Pathog, 2006. **2**(9): p. e99.
191. Elliott, L.H., et al., *Ebola protein analyses for the determination of genetic organization*. Arch Virol, 1993. **133**(3-4): p. 423-36.
192. Timmins, J., et al., *Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40*. Virology, 2001. **283**(1): p. 1-6.
193. Panchal, R.G., et al., *In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15936-41.
194. Timmins, J., et al., *Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40*. Virology, 2003. **312**(2): p. 359-68.
195. Jayakar, H.R., K.G. Murti, and M.A. Whitt, *Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release*. J Virol, 2000. **74**(21): p. 9818-27.

196. Harty, R.N., et al., *A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding.* J Virol, 1999. **73**(4): p. 2921-9.
197. Craven, R.C., et al., *Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras.* J Virol, 1999. **73**(4): p. 3359-65.
198. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding.* Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
199. Timmins, J., et al., *Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4.* J Mol Biol, 2003. **326**(2): p. 493-502.
200. Licata, J.M., et al., *Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles.* J Virol, 2004. **78**(14): p. 7344-51.
201. Yasuda, J., et al., *Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells.* J Virol, 2003. **77**(18): p. 9987-92.
202. Neumann, G., et al., *Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture.* J Virol, 2005. **79**(16): p. 10300-7.
203. Reynard, O., et al., *Unconventional Secretion of Ebola Virus Matrix Protein VP40.* J Infect Dis, 2011. **204 Suppl 3**: p. S833-9.
204. Han, Z., et al., *Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding.* J Virol, 2003. **77**(3): p. 1793-800.
205. Bamberg, S., et al., *VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles.* J Virol, 2005. **79**(21): p. 13421-33.
206. Kiley, M.P., et al., *Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus.* J Gen Virol, 1988. **69 (Pt 8)**: p. 1957-67.
207. Hoenen, T., et al., *Infection of naive target cells with virus-like particles: implications for the function of ebola virus VP24.* J Virol, 2006. **80**(14): p. 7260-4.
208. Watanabe, S., et al., *Production of novel ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to ebola virus generation by reverse genetics.* J Virol, 2004. **78**(2): p. 999-1005.
209. Mateo, M., et al., *Knockdown of Ebola Virus VP24 Impairs Viral Nucleocapsid Assembly and Prevents Virus Replication.* J Infect Dis, 2011. **204 Suppl 3**: p. S892-6.
210. Will, C., et al., *Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein.* J Virol, 1993. **67**(3): p. 1203-10.
211. Sanchez, A., et al., *The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3602-7.
212. Volchkov, V.E., *Processing of the Ebola virus glycoprotein.* Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **235**: p. 35-47.
213. Weissenhorn, W., et al., *The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6032-6.
214. Ito, H., et al., *Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies.* J Virol, 2001. **75**(3): p. 1576-80.
215. Feldmann, H., et al., *Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein.* Virology, 1994. **199**(2): p. 469-73.
216. Volchkov, V.E., et al., *Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5762-7.
217. Sanchez, A., et al., *Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus.* J Virol, 1998. **72**(8): p. 6442-7.
218. Volchkov, V.E., et al., *Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection.* Virology, 1998. **245**(1): p. 110-9.
219. Takada, A., et al., *A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14764-9.
220. Chandran, K., et al., *Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1643-5.
221. Manicassamy, B., et al., *Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry.* J Virol, 2005. **79**(8): p. 4793-805.
222. Volchkov, V.E., V.M. Blinov, and S.V. Netesov, *The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses.* FEBS Lett, 1992. **305**(3): p. 181-4.

223. Chan, S.Y., M.C. Ma, and M.A. Goldsmith, *Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2155-9.
224. Simmons, G., et al., *Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence*. J Virol, 2002. **76**(5): p. 2518-28.
225. Takada, A., et al., *Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry*. Virology, 2000. **278**(1): p. 20-6.
226. Reynard, O., et al., *Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9596-601.
227. Francica, J.R., et al., *Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001098.
228. Dolnik, O., et al., *Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus*. EMBO J, 2004. **23**(10): p. 2175-84.
229. Bukreyev, A., et al., *The GP-protein of Marburg virus contains the region similar to the 'immunosuppressive domain' of oncogenic retrovirus P15E proteins*. FEBS Lett, 1993. **323**(1-2): p. 183-7.
230. Ignatiev, G.M., *Immune response to Filovirus infection*. Current Topic in microbiology and immunology, 1998. **235**: p. 205.
231. Jouvenet, N., et al., *Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1837-44.
232. Kaletsky, R.L., et al., *Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2886-91.
233. Volchkova, V.A., et al., *The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer*. Virology, 1998. **250**(2): p. 408-14.
234. Volchkova, V.A., H.D. Klenk, and V.E. Volchkov, *Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus*. Virology, 1999. **265**(1): p. 164-71.
235. Wahl-Jensen, V.M., et al., *Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10442-50.
236. Sanchez, A., et al., *Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S164-9.
237. Lin, G., et al., *Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 1337-46.
238. Simmons, G., et al., *DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells*. Virology, 2003. **305**(1): p. 115-23.
239. Bhattacharyya, S., et al., *Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway*. Virology, 2010. **401**(1): p. 18-28.
240. Empig, C.J. and M.A. Goldsmith, *Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 5266-70.
241. Aleksandrowicz, P., et al., *Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis*. J Infect Dis, 2011. **204** Suppl 3: p. S957-67.
242. Mulherkar, N., et al., *The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway*. Virology, 2011. **419**(2): p. 72-83.
243. Hunt, C.L., et al., *The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 334-47.
244. Nanbo, A., et al., *Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001121.
245. Saeed, M.F., et al., *Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001110.
246. Cote, M., et al., *Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 344-8.
247. Carette, J.E., et al., *Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 340-3.
248. Bhattacharyya, S. and T.J. Hope, *Full-length Ebola glycoprotein accumulates in the endoplasmic reticulum*. Virol J, 2011. **8**: p. 11.
249. Rollin, P.E., et al., *Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S108-14.

250. Geisbert, T.W., et al., *Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(5): p. 503-7.
251. Feldmann, H., et al., *Therapy and prophylaxis of Ebola virus infections*. Curr Opin Investig Drugs, 2005. **6**(8): p. 823-30.
252. Ryabchikova, E.I., L.V. Kolesnikova, and S.V. Luchko, *An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 1**: p. S199-202.
253. Geisbert, T.W., et al., *Marburg virus Angola infection of rhesus macaques: pathogenesis and treatment with recombinant nematode anticoagulant protein c2*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S372-81.
254. Qiu, X., et al., *Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSVDeltaG/ZEBOVGP vaccine stimulates strong ebola GP-specific immune responses*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5547.
255. Jaax, N.K., et al., *Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure*. Arch Pathol Lab Med, 1996. **120**(2): p. 140-55.
256. Johnson, E., et al., *Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus*. Int J Exp Pathol, 1995. **76**(4): p. 227-36.
257. van der Groen, G., W. Jacob, and S.R. Pattyn, *Ebola virus virulence for newborn mice*. J Med Virol, 1979. **4**(3): p. 239-40.
258. Pfeifer, K., et al., *Evidence for age-dependent impairment of antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase/ribonuclease L-system in tissues of rat*. Mech Ageing Dev, 1993. **67**(1-2): p. 101-14.
259. Warfield, K.L., et al., *Development of a model for marburgvirus based on severe-combined immunodeficiency mice*. Virol J, 2007. **4**: p. 108.
260. Bray, M., et al., *A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever*. J Infect Dis, 1998. **178**(3): p. 651-61.
261. Warfield, K.L., et al., *Development and characterization of a mouse model for Marburg hemorrhagic fever*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6404-15.
262. Ebihara, H., et al., *Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice*. PLoS Pathog, 2006. **2**(7): p. e73.
263. Connolly, B.M., et al., *Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 1**: p. S203-17.
264. Ryabchikova, E., et al., *Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis*. Arch Virol, 1996. **141**(5): p. 909-21.
265. Lofts, L.L., et al., *Genomic differences between guinea pig lethal and nonlethal Marburg virus variants*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S305-12.
266. Hevey, M., et al., *Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants*. Virology, 1997. **239**(1): p. 206-16.
267. Simpson, D.I., I. Zlotnik, and D.A. Rutter, *Vervet monkey disease. Experiment infection of guinea pigs and monkeys with the causative agent*. Br J Exp Pathol, 1968. **49**(5): p. 458-64.
268. Volchkov, V.E., et al., *Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus*. Virology, 2000. **277**(1): p. 147-55.
269. *Ebola Reston virus detected pigs in the Philippines*. Euro Surveill, 2009. **14**(4).
270. Neumann, G., et al., *Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture*. J Virol, 2002. **76**(1): p. 406-10.
271. Hoenen, T., et al., *Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses*. Antiviral Res, 2011. **91**(2): p. 195-208.
272. Liu, Y., et al., *Conserved motifs within Ebola and Marburg virus VP40 proteins are important for stability, localization, and subsequent budding of virus-like particles*. J Virol, 2010. **84**(5): p. 2294-303.
273. Warfield, K.L., et al., *Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S430-7.
274. Warfield, K.L., et al., *Filovirus-like particles produced in insect cells: immunogenicity and protection in rodents*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S421-9.
275. Swenson, D.L., et al., *Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections*. Vaccine, 2005. **23**(23): p. 3033-42.
276. Wenigenrath, J., et al., *Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 5): p. 1325-34.
277. Jordan, I., et al., *Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara*. Virus Res, 2009. **145**(1): p. 54-62.

278. Wang, Y.P., X.E. Zhang, and H.P. Wei, *Laboratory detection and diagnosis of filoviruses*. Virol Sin, 2011. **26**(2): p. 73-80.
279. Alazard-Dany, N., M. Ottmann Terrangle, and V. Volchkov, *[Ebola and Marburg viruses: the humans strike back]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(4): p. 405-10.
280. Lloyd, E.S., et al., *Long-term disease surveillance in Bandundu region, Democratic Republic of the Congo: a model for early detection and prevention of Ebola hemorrhagic fever*. J Infect Dis, 1999. **179** Suppl 1: p. S274-80.
281. W.H.O. Global Alert and Response. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/WHO EMC ESR 98 2 EN/en/> consulté le 26/10/2011;
282. Formenty, P., et al., *[Training the trainers seminar and analysis of the Ebola virus hemorrhagic fever outbreaks in central Africa from 2001 to 2004. (Brazzaville, Republic of Congo, April 6-8, 2004)]*. Bull Soc Pathol Exot, 2005. **98**(3): p. 244-54.
283. Sullivan, N.J., et al., *Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 393-400.
284. Martin, J.E., et al., *A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(11): p. 1267-77.
285. Lupton, H.W., et al., *Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model*. Lancet, 1980. **2**(8207): p. 1294-5.
286. Chupurnov, A.A., et al., *[Attempts to develop a vaccine against Ebola fever]*. Vopr Virusol, 1995. **40**(6): p. 257-60.
287. Mikhailov, V.V., et al., *[The evaluation in hamadryas baboons of the possibility for the specific prevention of Ebola fever]*. Vopr Virusol, 1994. **39**(2): p. 82-4.
288. Enterlein, S., et al., *VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 984-93.
289. Halfmann, P., et al., *Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3810-5.
290. Lee, J.S., et al., *Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice*. Vaccine, 2006. **24**(47-48): p. 6886-92.
291. Pushko, P., et al., *Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus*. Vaccine, 2000. **19**(1): p. 142-53.
292. Olinger, G.G., et al., *Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14189-96.
293. Wilson, J.A., et al., *Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35, and VP40 proteins*. Virology, 2001. **286**(2): p. 384-90.
294. Reynard, O., et al., *Kunjin Virus Replicon-Based Vaccines Expressing Ebola Virus Glycoprotein GP Protect the Guinea Pig Against Lethal Ebola Virus Infection*. J Infect Dis, 2011. **204** Suppl 3: p. S1060-5.
295. Wang, D., et al., *Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2738-46.
296. Sullivan, N.J., et al., *Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 681-4.
297. Swenson, D.L., et al., *Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(3): p. 460-7.
298. Sullivan, N.J., et al., *CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1128-31.
299. Cohen, J., *AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm?* Science, 2007. **318**(5853): p. 1048-9.
300. Geisbert, T.W., et al., *Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4222-33.
301. Bukreyev, A., et al., *Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10293-306.
302. Bukreyev, A., et al., *Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6379-88.
303. Yang, L., et al., *A paramyxovirus-vectored intranasal vaccine against Ebola virus is immunogenic in vector-immune animals*. Virology, 2008. **377**(2): p. 255-64.

304. Bukreyev, A.A., et al., *Mucosal parainfluenza virus-vectored vaccine against Ebola virus replicates in the respiratory tract of vector-immune monkeys and is immunogenic*. Virology, 2010. **399**(2): p. 290-8.
305. Garbutt, M., et al., *Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5458-65.
306. Feldmann, H., et al., *Effective post-exposure treatment of Ebola infection*. PLoS Pathog, 2007. **3**(1): p. e2.
307. Geisbert, T.W., et al., *Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5664-8.
308. Jones, S.M., et al., *Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 786-90.
309. Geisbert, T.W., et al., *Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000225.
310. Geisbert, T.W., et al., *Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus*. J Virol, 2009. **83**(14): p. 7296-304.
311. Tsuda, Y., et al., *A replicating cytomegalovirus-based vaccine encoding a single Ebola virus nucleoprotein CTL epitope confers protection against Ebola virus*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(8): p. e1275.
312. Konduru, K., et al., *Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice*. Vaccine, 2011. **29**(16): p. 2968-77.
313. Mellquist-Riemenschneider, J.L., et al., *Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs*. Virus Res, 2003. **92**(2): p. 187-93.
314. Hensley, L.E., et al., *Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S390-9.
315. Ignat'ev, G.M., et al., *[Experimental study of possible treatment of Marburg hemorrhagic fever with desferal, ribavirin, and homologous interferon]*. Vopr Virusol, 1996. **41**(5): p. 206-9.
316. Huggins, J., Z.X. Zhang, and M. Bray, *Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 1**: p. S240-7.
317. Geisbert, T.W., et al., *Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference*. J Infect Dis, 2006. **193**(12): p. 1650-7.
318. Warfield, K.L., et al., *Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers*. PLoS Pathog, 2006. **2**(1): p. e1.
319. Swenson, D.L., et al., *Chemical modifications of antisense morpholino oligomers enhance their efficacy against Ebola virus infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 2089-99.
320. Warren, T.K., et al., *Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 991-4.
321. Tuffs, A., *Experimental vaccine may have saved Hamburg scientist from Ebola fever*. BMJ, 2009. **338**: p. b1223.
322. Maruyama, T., et al., *Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 6024-30.
323. Wilson, J.A., et al., *Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1664-6.
324. Parren, P.W., et al., *Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 6408-12.
325. Bray, M. and J. Paragas, *Experimental therapy of filovirus infections*. Antiviral Res, 2002. **54**(1): p. 1-17.
326. Mupapa, K., et al., *Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients*. International Scientific and Technical Committee. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 1**: p. S18-23.
327. Jahrling, P.B., et al., *Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses*. Arch Virol Suppl, 1996. **11**: p. 135-40.
328. Jahrling, P.B., et al., *Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S400-3.
329. Oswald, W.B., et al., *Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys*. PLoS Pathog, 2007. **3**(1): p. e9.
330. Shibata, T., et al., *Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13568-73.
331. van Horssen, J., et al., *Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(12): p. 1729-37.

332. Ramsey, C.P., et al., *Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(1): p. 75-85.
333. Clements, C.M., et al., *DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15091-6.
334. Wang, X. and C.X. Hai, *ROS Acts as a Double-Edged Sword in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Is Nrf2 a Potential Target for the Treatment?* Mini Rev Med Chem, 2011.
335. Suzuki, M., et al., *Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(6): p. 673-82.
336. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
337. Dhakshinamoorthy, S. and A.K. Jaiswal, *Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3906-17.
338. Sekhar, K.R., et al., *Redox-sensitive interaction between KIAA0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of gamma-glutamylcysteine synthetase*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(7): p. 650-62.
339. McMahon, M., et al., *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21592-600.
340. Itoh, K., et al., *Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles*. Genes Cells, 2003. **8**(4): p. 379-91.
341. Kobayashi, A., et al., *Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7130-9.
342. Cullinan, S.B., et al., *The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8477-86.
343. Furukawa, M. and Y. Xiong, *BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(1): p. 162-71.
344. Li, X., et al., *Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54750-8.
345. Lo, S.C., et al., *Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3605-17.
346. Tong, K.I., et al., *Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 2887-900.
347. Ogura, T., et al., *Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 2842-7.
348. Wakabayashi, N., et al., *Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2040-5.
349. Fourquet, S., et al., *Activation of NRF2 by nitrosative agents and H2O2 involves KEAP1 disulfide formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8463-71.
350. Komatsu, M., et al., *The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 213-23.
351. Lau, A., et al., *A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(13): p. 3275-85.
352. Jain, A., et al., *p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22576-91.
353. Fan, W., et al., *Keap1 facilitates p62-mediated ubiquitin aggregate clearance via autophagy*. Autophagy, 2010. **6**(5).
354. Karapetian, R.N., et al., *Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1089-99.
355. Chen, W., et al., *Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response*. Mol Cell, 2009. **34**(6): p. 663-73.
356. Lo, S.C. and M. Hannink, *PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37893-903.

357. Lo, S.C. and M. Hannink, *PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(8): p. 1789-803.
358. Yu, M., et al., *Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway*. *Cell Signal*, 2011. **23**(5): p. 883-92.
359. Kim, J.E., et al., *Suppression of NF-kappaB signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation*. *Cell Signal*, 2010. **22**(11): p. 1645-54.
360. Strachan, G.D., L.A. Ostrow, and K.L. Jordan-Sciutto, *Expression of the fetal Alz-50 clone 1 protein induces apoptotic cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **336**(2): p. 490-5.
361. Niture, S.K. and A.K. Jaiswal, *INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2011 **18**(3): p. 439-51.
362. Theodore, M., et al., *Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(14): p. 8984-94.
363. Huang, H.C., T. Nguyen, and C.B. Pickett, *Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(23): p. 12475-80.
364. Bloom, D.A. and A.K. Jaiswal, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44675-82.
365. Li, W., et al., *Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(10): p. 1847-56.
366. Katoh, Y., et al., *Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription*. *Genes Cells*, 2001. **6**(10): p. 857-68.
367. Sun, Z., Y.E. Chin, and D.D. Zhang, *Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(10): p. 2658-72.
368. Kawai, Y., et al., *Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization*. *J Biol Chem*, 2011 **286**(9): p. 7629-40.
369. Mercado, N., et al., *Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **406**(2): p. 292-8.
370. Venugopal, R. and A.K. Jaiswal, *Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14960-5.
371. Maines, M.D., *The heme oxygenase system and its functions in the brain*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000. **46**(3): p. 573-85.
372. Wunder, C. and R.F. Potter, *The heme oxygenase system: its role in liver inflammation*. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2003. **3**(3): p. 199-208.
373. Moinova, H.R. and R.T. Mulcahy, *Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **261**(3): p. 661-8.
374. Wild, A.C., H.R. Moinova, and R.T. Mulcahy, *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(47): p. 33627-36.
375. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p. 313-22.
376. Lee, O.H., et al., *An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(50): p. 36412-20.
377. Sun, Z., et al., *KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response*. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(9): p. 1800-11.
378. Nguyen, T., et al., *Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(37): p. 32485-92.
379. Sun, Z., et al., *Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(18): p. 6334-49.
380. Velichkova, M. and T. Hasson, *Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(11): p. 4501-13.

381. Kang, H.J., et al., *CR6-interacting factor 1 (CRIF1) regulates NF-E2-related factor 2 (NRF2) protein stability by proteasome-mediated degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21258-68.
382. Thimmulappa, R.K., et al., *Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 984-95.
383. Rushworth, S.A., D.J. MacEwan, and M.A. O'Connell, *Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6730-7.
384. Rushworth, S.A., S. Shah, and D.J. MacEwan, *TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 702-7.
385. Chaturvedi, U.C. and R. Nagar, *Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance?* FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **56**(1): p. 9-24.
386. Drew, C.P., et al., *Bluetongue virus infection activates bovine monocyte-derived macrophages and pulmonary artery endothelial cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2010 **136**(3-4): p. 292-6.
387. Gargouri, B., et al., *Induction of Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle in vitro causes oxidative stress in lymphoblastoid B cell lines*. Mol Cell Biochem, 2009. **324**(1-2): p. 55-63.
388. Jackson, A.C., W. Kammouni, and P. Fernyhough, *Role of oxidative stress in rabies virus infection*. Adv Virus Res, 2011. **79**: p. 127-38.
389. Epstein, L.G., *HIV neuropathogenesis and therapeutic strategies*. Acta Paediatr Jpn, 1998. **40**(2): p. 107-11.
390. Qiang, W., et al., *Astrocytes survive chronic infection and cytopathic effects of the ts1 mutant of the retrovirus Moloney murine leukemia virus by upregulation of antioxidant defenses*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3273-84.
391. Jiang, Y., et al., *Retrovirus-induced oxidative stress with neuroimmunodegeneration is suppressed by antioxidant treatment with a refined monosodium alpha-luminol (Galavit)*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4557-69.
392. Reddy, P.V., et al., *Neuroprotective effects of the drug GVT (monosodium luminol) are mediated by the stabilization of Nrf2 in astrocytes*. Neurochem Int, 2010. **56**(6-7): p. 780-8.
393. Kuang, X., et al., *Attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis by minocycline prevents retrovirus-induced neurodegeneration in mice*. Brain Res, 2009. **1286**: p. 174-84.
394. Scofield, V.L., et al., *The drug monosodium luminol (GVT) preserves thymic epithelial cell cytoarchitecture and allows thymocyte survival in mice infected with the T cell-tropic, cytopathic retrovirus ts1*. Immunol Lett, 2009. **122**(2): p. 159-69.
395. Scofield, V.L., et al., *The drug monosodium luminol (GVT) preserves crypt-villus epithelial organization and allows survival of intestinal T cells in mice infected with the ts1 retrovirus*. Immunol Lett, 2009. **122**(2): p. 150-8.
396. Zhang, H.S., et al., *Nrf2 is involved in inhibiting Tat-induced HIV-1 long terminal repeat transactivation*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(3): p. 261-8.
397. Cho, H.Y., et al., *Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(2): p. 138-50.
398. Hosakote, Y.M., et al., *Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(11): p. 1550-60.
399. Kesic, M.J., et al., *Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 444-53.
400. Yageta, Y., et al., *Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 4679-90.
401. Crespo, I., et al., *Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin*. J Pineal Res, 2010. **49**(2): p. 193-200.
402. Jung, K.H., et al., *Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model*. J Pineal Res, 2009. **47**(2): p. 173-83.
403. Cho, I.J., et al., *Role of hepatitis B virus X repression of C/EBPbeta activity in the down-regulation of glutathione S-transferase A2 gene: implications in other phase II detoxifying enzyme expression*. Xenobiotica, 2009. **39**(2): p. 182-92.

404. Schaedler, S., et al., *Hepatitis B virus induces expression of antioxidant response element-regulated genes by activation of Nrf2*. J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 41074-86.
405. Burdette, D., M. Olivarez, and G. Waris, *Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 3): p. 681-90.
406. Moriya, K., et al., *Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells*. J Med Virol, 2010. **82**(5): p. 776-92.
407. Hou, W.H., et al., *Iron increases HMOX1 and decreases hepatitis C viral expression in HCV-expressing cells*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(36): p. 4499-510.
408. Velmurugan, K., et al., *Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the antioxidant supplement Protandim*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(3): p. 430-40.
409. Mehrab-Mohseni, M., et al., *Legalon-SIL downregulates HCV core and NS5A in human hepatocytes expressing full-length HCV*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(13): p. 1694-700.
410. Carvajal-Yepes, M., et al., *Hepatitis C virus impairs the induction of cytoprotective Nrf2 target genes by delocalization of small Maf proteins*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 8941-51.
411. Mateo, M., et al., *VP24 Is a Molecular Determinant of Ebola Virus Virulence in Guinea Pigs*. J Infect Dis, 2011. **204** Suppl 3: p. S1011-20.
412. Gietz, R.D. and R.A. Woods, *Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method*. Methods Mol Biol, 2006. **313**: p. 107-20.
413. Cullinan, S.B. and J.A. Diehl, *Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 317-32.
414. Delhon, I., et al., *Absence of estrogen receptor-related- α increases osteoblastic differentiation and cancellous bone mineral density*. Endocrinology, 2009. **150**(10): p. 4463-72.
415. Bianco, S., et al., *Modulating estrogen receptor-related receptor- α activity inhibits cell proliferation*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23286-92.
416. Cavallini, A., et al., *Oestrogen receptor-related receptor α (ERR α) and oestrogen receptors (ER α and ER β) exhibit different gene expression in human colorectal tumour progression*. Eur J Cancer, 2005. **41**(10): p. 1487-94.
417. Kwon, J.E., et al., *BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12664-72.
418. Angers, S., et al., *The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 348-57.
419. Li, J., et al., *Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells*. Toxicol Sci, 2005. **83**(2): p. 313-28.
420. Kim, D.J., et al., *Interaction of SPIN90 with the Arp2/3 complex mediates lamellipodia and actin comet tail formation*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 617-25.
421. Lim, C.S., et al., *Regulation of SPIN90 phosphorylation and interaction with Nck by ERK and cell adhesion*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52116-23.
422. Lim, C.S., et al., *SPIN90 (SH3 protein interacting with Nck, 90 kDa), an adaptor protein that is developmentally regulated during cardiac myocyte differentiation*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12871-8.
423. Cai, X., et al., *Metastatic potential of lung squamous cell carcinoma associated with HSPC300 through its interaction with WAVE2*. Lung Cancer, 2009. **65**(3): p. 299-305.
424. Miller, A.L. and W.M. Bement, *Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 71-7.
425. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 64-76.
426. Urata, S., et al., *Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4895-9.
427. Ivanov, A.V., et al., *Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24957.
428. Wilton, B.A., et al., *Ectromelia virus BTB/kelch proteins, EVM150 and EVM167, interact with cullin-3-based ubiquitin ligases*. Virology, 2008. **374**(1): p. 82-99.
429. Zheng, G., et al., *Brd4 regulation of papillomavirus protein E2 stability*. J Virol, 2009. **83**(17): p. 8683-92.

430. Harty, R.N., et al., *A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13871-6.
431. Zhang, L., N.Y. Villa, and G. McFadden, *Interplay between poxviruses and the cellular ubiquitin/ubiquitin-like pathways*. FEBS Lett, 2009. **583**(4): p. 607-14.
432. Barry, M. and K. Fruh, *Viral modulators of cullin RING ubiquitin ligases: culling the host defense*. Sci STKE, 2006. **2006**(335): p. pe21.
433. Kubota, T., et al., *Ebolavirus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6952-6.
434. Miki, H., et al., *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 93-6.
435. Nagai, N., et al., *Nrf2 is a critical modulator of the innate immune response in a model of uveitis*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(3): p. 300-6.
436. Wang, H., et al., *Role of Nrf2 in suppressing LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages by polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid*. Mol Pharm, 2010. **7**(6): p. 2185-93.
437. Thimmulappa, R.K., et al., *Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 883-9.
438. Chen, X.L. and C. Kunsch, *Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(8): p. 879-91.
439. Liu, X.M., et al., *Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 381-9.
440. El Mekki, A.A. and G. van der Groen, *A comparison of indirect immunofluorescence and electron microscopy for the diagnosis of some haemorrhagic viruses in cell cultures*. J Virol Methods, 1981. **3**(2): p. 61-9.
441. Watanabe, S., et al., *Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome*. J Infect Dis, 2007. **196 Suppl 2**: p. S284-90.
442. Journo, C., et al., *NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000521.